

**Zur Bestimmung  
der Aktivität der Nebennierenrinde  
bei Rindern**

**Christine Stock**



Aus dem Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere  
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München.  
Vorstand: Professor Dr. Dr. Johs. Brüggemann.

---

Zur Bestimmung  
der Aktivität der Nebennierenrinde  
bei Rindern.

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München



vorgelegt  
von  
Christine S t o c k  
aus  
Starnberg am See

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Universität München

Dekan: Professor Dr. H. Liebmann

Referent: Professor Dr. Dr. Johs. Brüggemann.

Tag der Promotion: 24. Juli 1957

U N I - Druck, München 13, Amalienstraße 85

## Inhaltsverzeichnis

|                                                                              | Seite |
|------------------------------------------------------------------------------|-------|
| I. EINLEITUNG                                                                | IV    |
| II. LITERATUR                                                                | 1     |
| A) Chemie der Steroidhormone                                                 | 1     |
| B) Stoffwechsel der Nebennierenrindenhormone                                 | 5     |
| C) Wirkungen der Nebennierenrindenhormone                                    | 8     |
| D) Bestimmung der Nebennierenrindenhormone und deren Abbauprodukte           | 10    |
| I. Aufarbeitung des Harns                                                    | 13    |
| 1. Gewinnung des Harns                                                       | 13    |
| 2. Hydrolyse                                                                 | 13    |
| a) Hydrolyse durch Kochen mit starken Säuren                                 | 13    |
| b) Hydrolyse durch Ansäuern bei Zimmertemperatur                             | 14    |
| c) Hydrolyse mit Hilfe von Fermenten                                         | 14    |
| 3. Extraktion                                                                | 14    |
| 4. Fraktionierung                                                            | 14    |
| a) Trennung in saure, neutrale und phenolische Anteile                       | 15    |
| b) Trennung der neutralen Steroide in ketonische und nichtketonische Anteile | 15    |
| c) Trennung der neutralen Steroide in $\alpha$ - und $\beta$ -Steroide       | 17    |
| d) Weitere Trennungsmethoden der Steroide                                    | 17    |
| 5. Entfernung des Extraktionsmittels                                         | 17    |
| II. Quantitative Bestimmung des Harnextraktes                                | 17    |
| 1. Biologische Methoden                                                      | 17    |
| 2. Physikalische Methoden                                                    | 18    |
| 3. Chemische (colorimetrische) Methoden                                      | 18    |
| a) Bestimmung der neutralen 17-Ketosteroide                                  | 18    |
| b) Bestimmung der Corticoide ( $C_{21}$ -Steroide)                           | 20    |

|                                                                                                                            | Seite |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| III. Möglichkeiten der Entfernung störender Harnfarbstoffe                                                                 | 20    |
| 1. Entfernung vor der Hydrolyse                                                                                            | 21    |
| 2. Entfernung während der Fraktionierung                                                                                   | 21    |
| 3. Entfernung kurz vor der kolorimetrischen Messung                                                                        | 21    |
| 4. Entfernung während der kolorimetrischen Messung                                                                         | 21    |
| Eigene Untersuchungen                                                                                                      |       |
| III. VERSUCHSTIERE                                                                                                         | 23    |
| IV. METHODIK                                                                                                               | 25    |
| A) Gewinnung des Harns                                                                                                     | 25    |
| B) Vorbereitende Arbeiten                                                                                                  | 26    |
| I. Bestimmung der Harnmenge                                                                                                | 26    |
| II. Bestimmung des spezifischen Gewichtes                                                                                  | 26    |
| III. Destillation des Äthers                                                                                               | 26    |
| C) Aufarbeitung des Harns                                                                                                  | 27    |
| I. Aufarbeitung zur Bestimmung der "ungereinigten" 17-Ketosteroide (= 17-Ketosteroide ohne Anwendung der GIRARD-Reinigung) | 27    |
| 1. Reagentien                                                                                                              | 27    |
| 2. Hydrolyse                                                                                                               | 27    |
| 3. Extraktion                                                                                                              | 27    |
| 4. Fraktionierung in saure, neutrale und phenolische Anteile                                                               | 28    |
| 5. Entfernung des Extraktionsmittels                                                                                       | 29    |
| II. Aufarbeitung zur Bestimmung der "gereinigten" 17-Ketosteroide (= 17-Ketosteroide mit Anwendung der GIRARD-Reinigung)   | 29    |
| 1. Reagentien                                                                                                              | 29    |
| 2. Hydrolyse                                                                                                               | 29    |
| 3. Extraktion                                                                                                              | 29    |
| 4. Fraktionierung in saure, neutrale und phenolische Anteile                                                               | 29    |
| 5. Entfernung des Extraktionsmittels                                                                                       | 29    |
| 6. Fraktionierung in ketonische und nicht ketonische Anteile mit Hilfe des GIRARD-Verfahrens                               | 29    |

|                                                                                                 | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| a) Reagentien                                                                                   | 30    |
| b) Überführung der ätherlöslichen Ketosteroide<br>in wasserlösliche Hydrazone                   | 30    |
| c) Rückführung der wasserlöslichen Hydrazone<br>in ätherlösliche Ketosteroide                   | 31    |
| d) Entfernung des Extraktionsmittels                                                            | 31    |
| D) Quantitative Bestimmung des Harnextraktes mit der<br>m-Dinitrobenzolreaktion nach ZIMMERMANN | 32    |
| E) Bestimmung des Filterschwerpunktes                                                           | 33    |
| F) Aufstellung der Eichkurve                                                                    | 33    |
| V. ERGEBNISSE                                                                                   | 36    |
| VI. BESPRECHUNG VON METHODIK UND ERGEBNISSEN                                                    | 44    |
| 1. Zur Methodik                                                                                 | 44    |
| a) Beziehungen zwischen der Harnmenge<br>und dem spez. Gewicht                                  | 44    |
| b) Zur Konservierung des Harnes                                                                 | 44    |
| c) Zur GIRARD-Trennungsmethode                                                                  | 45    |
| 2. Zu den Ergebnissen                                                                           | 47    |
| VII. ZUSAMMENFASSUNG                                                                            | 50    |
| VIII. LITERATURVERZEICHNIS                                                                      | 51    |

## I. EINLEITUNG

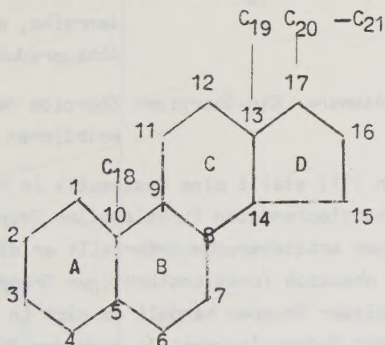
Über die Bedeutung der Nebennierenrinde beim gesunden und kranken Haustier liegen, im Gegensatz zur Humanmedizin, bis heute in der Tierheilkunde nur wenige Erfahrungen vor (Brüggemann u. Mitarb., 9; Holcombe, 32; Meschaks, 46). Es sind lediglich eingehende histologische Untersuchungen über die Nebennieren von Schweinen vorhanden (Mattias, 45). Hinsichtlich der tatsächlichen Funktion eines endokrinen Organes ist jedoch die Aussagebreite einer solchen Methode außerordentlich beschränkt. Es ergibt sich deshalb für die Aufnahme entsprechender Arbeitsrichtungen die Notwendigkeit, Verfahren zur Bestimmung der Aktivität der Nebennierenrinde intra vitam vom Menschen für die Anwendbarkeit am Tiere zu überprüfen, das heißt, entsprechende Methoden auszuarbeiten und Normalwerte zu erstellen.

Herr Professor Dr. Dr. Johs. Brüggemann hat mir daher die Aufgabe gestellt, die vorliegende Frage bei Rindern zu bearbeiten.

## II. L I T E R A T U R

### A) Chemie der Steroidhormone

Die Hormone der Nebennierenrinde (NNR), der männlichen und weiblichen Keimdrüsen sowie der Placenta gehören zur großen Gruppe der Steroidhormone, deren Grundgerüst der gesättigte Kohlenwasserstoff Cyclopentanoperhydrophenantren, auch Steran genannt, ist.



Die einzelnen Steroidhormone unterscheiden sich strukturell durch Änderungen in den Seitenketten, durch Fehlen oder Vorhandensein von Keto- oder Hydroxylgruppen in der 3-, 11- oder 17-Stellung, durch einfache oder Doppelbindungen an verschiedenen Stellen des Sterinskeletts und durch die räumliche Anordnung der einzelnen Substituenten. Auf diese Weise entsteht eine sehr große Zahl von Steroidkörpern, die zum Teil mehr oder weniger deutlich ausgeprägte biologische Wirkung (corticoide, androgene, östrogene oder gestagene Wirkung) aufweisen. Jedoch kommen nicht alle denkbaren Verbindungen, sondern nur ein Teil in der Natur vor, als tatsächlich von den entsprechenden, endokrinen Drüsen sezernierte und wirksame Hormone oder als deren verschiedenartigste Abbauprodukte.

Da in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben über Zahl und Wirkung der Steroidhormone und deren Abbauprodukte zu finden sind (vgl. H o p p e - S e y l e r - T h i e r f e l d e r (34), S t a u d i n g e r (67), A b d e r h a l d e n (1) u.a.), besteht auch bis jetzt noch keine eindeutige Systematik. Eine Einteilung derselben kann entweder nach der physiologischen Wirkungsweise oder nach ihrer chemischen Struktur vorgenommen werden. So wurden z.B. die NNR-Hormone nach ihrer Wirkung auf den Mineral-, Kohlehydrat- und Eiweißstoffwechsel in Mineralo-, Gluco- und N-(= nitrogen)-Corticoide unter-

teilt (siehe hierzu S. 8). Eine Systematik nach der chemischen Struktur dürfte jedoch umfassender und deshalb befriedigender sein. So findet man in der Literatur die grobschematische Einteilung nach der Gesamtzahl der C-Atome (H o p S e y l e r - T h i e r f e l d e r (34), J u n k m a n n (36), F i e s e r (37), S t a u d i n g e r (66, 67), die zum Teil auch die Physiologie berücksichtigt und zwar:

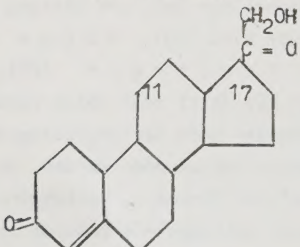
Steroide mit 21 C-Atomen =  $C_{21}$ -Steroide: Steroide der allo-Pregnan- und Pregnanreihe, aus der NNR stammend

= Steroide mit 19 C-Atomen =  $C_{19}$ -Steroide: Steroide der Androstan- und Ätiocholanreihe, aus den Testes stammend und Abbauprodukte der  $C_{21}$ -Steroide

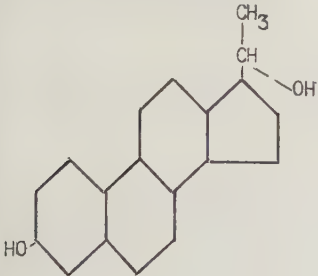
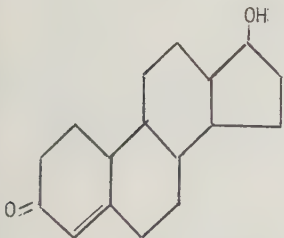
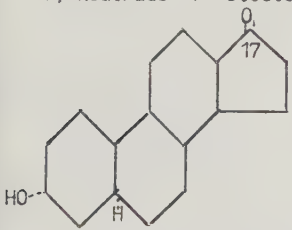
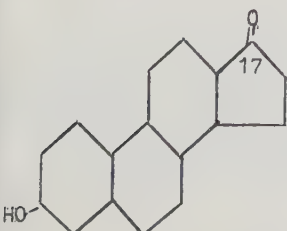
Steroide mit 18 C-Atomen =  $C_{18}$ -Steroide: Steroide der Östranreihe, aus den weiblichen Keimdrüsen stammend.

Z i m m e r m a n n (91) stellt eine Systematik im Hinblick auf die chemische Bestimmung der hervorstechendsten funktionellen Gruppen auf, wodurch aber vielfach Überschneidungen entstehen. So unterteilt er die Steroidhormone und ihre Abbauprodukte nach chemisch funktionstüchtigen Gruppen an den Kohlenstoffatomen 3, 11 und 17. Bei diesen Gruppen handelt es sich in der Regel um Sauerstoff in Form einer Keto- oder Hydroxylgruppe; je nach dem Sitz der Ketogruppe am 3- oder 17-C-Atom spricht man von 3- oder 17-Ketosteroiden, nach dem Sitz der Hydroxylgruppen an einem gesättigten oder aromatischen Ring von alkoholischen oder phenolischen Steroiden und bei Vorliegen der Ketolkonfiguration  $-CO-CH_2OH$  von reduzierenden Steroiden.

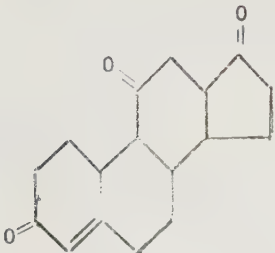
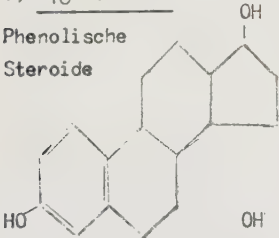
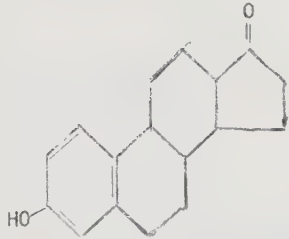
Systematischer Überblick über einige charakteristische Vertreter der Steroidhormone bzw. deren Ausscheidungsprodukte  
(Substituenten, wie Methylgruppen o.ä., sind der Übersicht wegen in dieser Zusammenstellung fortgelassen worden):

| Formel                                                                                                                                                     | Bezeichnung                                                                                                                | Herkunft   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <p>1) <math>C_{21}</math>-Steroide</p> <p>a) Reduzierende Steroide</p>  | <p>11-Oxycorticoide und<br/>11-Desoxycorticoide<br/>(6 Verbindungen je<br/>nach Substitution an<br/>C-Atom 11 bzw. 17)</p> | <p>NNR</p> |

Fortsetzung Tab.:

| Formel                                                                                                                                             | Bezeichnung           | Herkunft                                     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------|
| <p>b) Alkoholische Steroide</p>                                    | Pregnandiol           | Ausscheidungsprodukt des Progesterons        |
| <p>2) <u>C<sub>19</sub>-Steroide</u></p> <p>a) 3-Ketosteroide</p>  | Testosteron           | Testes                                       |
| <p>b) Neutrale 17-Ketosteroide</p>                               | Androsteron           | NNR<br>Ausscheidungsprodukt des Testosterons |
|                                                                  | Dehydroisoandrosteron | NNR                                          |

Fortsetzung Tab.:

| Formel:                                                                                                                                                | Bezeichnung                 | Herkunft                               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------|
|                                                                       | Adrenosteron                | NNR                                    |
| <p>3) <u>C<sub>18</sub>-Steroide</u></p> <p>Phenolische Steroide</p>  | Östradiol<br>Follikelhormon | Eierstock, Placenta                    |
|                                                                       | Östriol                     | Ausscheidungsprodukt<br>des Östradiols |
|                                                                      | Östron                      | Ausscheidungsprodukt<br>des Östradiols |

Was die Zahl der bekannten NNR-Hormone betrifft, so wurden von Reichstein (57 - 61), Kendall (37, 38) und Wintersteiner (82) ca. 30 verschiedene Steroide in kristalliner Form aus Nebennierenextrakten isoliert; jedoch sollen nur 7 davon spezifisch wirksame und tatsächlich von der NNR sezernierte Hormone sein (in obiger Übersicht unter 1 a).

## B) Stoffwechsel der Nebennierenrindenhormone

Über den Stoffwechsel der NNR-Hormone ist im Vergleich zu dem der Sexualhormone wenig bekannt.

Die Bildung der Hormone erfolgt vor allem in der Zona fasciculata und Zona arcuata, z.T. auch in der Zona reticularis der Nebennierenrinde (A b d e r h a l d e n , 1).

V o g t (78) bestimmte zuerst mit Hilfe biologischer Methoden die Corticosteroide im Nebennierenvenenblut und konnte folgendes feststellen: pro Minute wird etwa das Zehnfache des jeweiligen Gehaltes der Drüse sezerniert, das heißt also, daß die Biosynthese der Hormone immerwährend und sehr schnell vor sich geht. Die Differenzierung der im Nebennierenvenenblut gefundenen biologisch aktiven Sekretionsprodukte wurde mit papierchromatographischen Verfahren durchgeführt (N e l s o n und Mitarbeiter (49), P i n c u s und Mitarb. (54, 55) u.a.), z.T. an lebenden Tieren (Hund, Katze, Kaninchen) oder an isolierten Rindernebennieren. Es zeigte sich, daß in erster Linie Corticosteron und 17-Oxycorticosteron sezerniert werden. Weiterhin kommen andere biolog. aktive Corticosteroide, androgen wirkende Steroide und verschiedene, noch nicht genau charakterisierte Steroidkörper zur Ausscheidung.

P i n c u s und Mitarb. (55), B l o c h (5, 6) u.a. stellten an isolierten, perfundierten Nebennieren Versuche an zur Klärung der wichtigen Frage, über welche Zwischenstufen die beiden wesentlichen Hormone Corticosteron und 17-Oxycorticosteron entstehen. Die Ergebnisse, teilweise allerdings noch Vermutungen, sind kurz folgende:

Aus Essigsäure kann im Organismus (z.B. in der Leber) leicht Cholesterin aufgebaut werden (B l o c h , 5, 6). Die Nebennierenrinde besitzt nun die Fähigkeit, nach Stimulierung durch das aus der Hypophyse stammende adrenocorticotrope Hormon (ACTH), das Cholesterin durch oxydativen Abbau seiner Seitenkette in Pregnenolon überzuführen. (Dabei nimmt gleichzeitig der Cholesteringehalt der NNR, bei längeren ACTH-Gaben auch der des Blutes ab). Weiterhin vermag die NNR - ohne Beeinflussung durch ACTH - die  $\alpha\beta$ -ungesättigte Ketogruppe an C-Atom 3 und die drei Hydroxylgruppen an den C-Atomen 11, 17, 21 einzuführen, wodurch in erster Linie Corticosteron, 17-Oxycorticosteron (und Progesteron) entstehen.



Bei Tieren ergaben Ketosteroidbestimmungen im Harn von Schweinen ( S c h m i t t ; 64) ebenfalls bei weiblichen und kastrierten Tieren eine gleiche Ausscheidung, durchschnittlich 3,95 mg/24 Std., bei einem Eber wurden 9,74 mg/24 Std. festgestellt. H o l c o m b e (32) fand bei gesunden, nicht trächtigen Kühen durchschnittlich 19 mg/Liter. Als normale Ausscheidungswerte bei Bullen wurden von M e s c h a k s (46) durchschnittlich 23,0 mg/Liter angegeben. M a s o n und E n g s t r o m (44) ermittelten beim Kaninchen Durchschnittswerte von 1,1 mg/24 Std.

Die 17-Ketosteroid-Ausscheidung steigt bis zur Erlangung der Geschlechtsreife an. Das Ausscheidungsmaximum liegt nach Z i m m e r m a n n (91) beim Menschen bei beiden Geschlechtern zwischen dem 20. und 35. Lebensjahr; die Ausscheidung sinkt danach bis zum 50. Lebensjahr ziemlich rasch, dann langsamer ab, ohne jedoch ganz aufzuhören. Eine Abhängigkeit der 17-Ketosteroid-Werte vom weiblichen Genitalzyklus ist nur undeutlich festzustellen und wird von manchen Autoren abgelehnt. Z i m m e r m a n n (91) konnte beim Menschen ein Ausscheidungsmaximum während der Ovulation und ein -minimum zur Zeit der Menstruation feststellen. Ein Einfluß des Wetters auf die 17-Ketosteroid-Ausscheidung wird von vielen Autoren beschrieben (siehe Z i m m e r m a n n ; 93).

Bei Tieren konnten B r ü g g e m a n n u. Mitarb. (9) an Schweinen deutliche Unterschiede der 17-Ketosteroid-Ausscheidung bei gesunden Tieren und solchen mit herabgesetzter NNR-Funktion beobachten. R i c h t e r (ref. in 9) fand bei zunehmender Domestikation der freilebenden Wanderratte eine anatomische und funktionelle Atrophie im NNR-System, was er durch die geringeren Adaptationsanforderungen an domestizierte Tiere erklärt. - H o l c o m b e (32) untersuchte gesunde Kühe während Trächtigkeit und Puerperium und stellte im letzten Schwangerschaftsmonat Durchschnittswerte von 45 mg/Liter und nach der Geburt ein deutliches Abfallen der Werte fest. M e c h a k s (46) fand erhöhte Werte bei Bullen mit künstlich hervorgerufenen Aspermie und nach längeren Transporten der Tiere.

Ein Einfluß der Diurese auf die 17-Ketosteroid-Ausscheidung wird im Schrifttum nicht näher angegeben oder verneint ( Z i m m e r m a n n , 91; S c h m i t t , 64). H o p p e - S e y l e r - T h i e r f e l d e r (34) schreiben, daß ein Einfluß bei einer mittleren Harnmenge beim Menschen von 0,8 - 1,2 Liter nicht vorhanden ist. M a s o n und E n g s t r o m (44) ermittelten beim Kaninchen "absolute, von der Harnmenge unabhängige" Werte.

H o l c o m b e (32) und M e s c h a k s (46) geben nur mg/Liter-Werte an; dabei benutzt H o l c o m b e nur einzelne Harnportionen zur Untersuchung und bezieht die mg/Liter-Werte auf ein durchschnittliches spezifisches Gewicht des Harnes von 1,035.

Eine Erhöhung der Ausscheidungswerte innerhalb des physiologischen Rahmens findet man bei jeder, über der Norm liegenden Belastung des Organismus (= S t r e s s , S e l y e , 63). Beim Menschen finden sich außerdem im Verlaufe verschiedener Krankheitsbilder (NNR-Tumoren, Cushing-Syndrom u.ä.) stark erhöhte 17-Ketosteroid-Werte, deren Bestimmung als Hilfsmittel zur Diagnostizierung dient.

Erniedrigte 17-Ketosteroid-Ausscheidung deutet grundsätzlich auf eine pathologische Hypofunktion der NNR hin.

### C) Wirkungen der Nebennierenrindenhormone

Die Nebenniere, und zwar die Rinde der Nebenniere, ist lebensnotwendig. Die Entfernung beider Nebennieren führt schon innerhalb kurzer Zeit zum Tode. Dies beruht nicht auf der Exstirpation des Nebennierenmarks, da dieses nach gesondeter Zerstörung bei sonst noch intakter Nebennierenrinde niemals einen Exitus zur Folge hat.

Die Wirkungen der NNR-Hormone beziehen sich auf den gesamten Stoffwechsel und sind sehr mannigfaltig.

So spielt die NNR in der Beantwortung jeglicher Reizung - exogener oder endogener Genese - auf den Organismus in dem Regulationssystem Hypothalamus - Hypophyse - Nebennierenrinde, dem sog. Hypophysen-Adrenalsystem, eine sehr bedeutende Rolle ( S e l y e , 63). Es wird nämlich jede außergewöhnliche Belastung des Organismus mit einer Intensivierung des Stoffwechsels (vermehrte ACTH-Ausschüttung neben gleichzeitiger Produktionshemmung gonadotroper und lactogener Hormone) und so mit seiner Adaptation beantwortet, die in einem gesetzmäßigen zeitlichen Ablauf vor sich geht.

Es wurden bestimmten Corticoidgruppen spezifische Stoffwechselwirkungen zugeschrieben (z.B. 11-Desoxycorticoide = "Mineralocorticoide" mit Wirkung auf den Mineralstoffwechsel usw.), doch scheint dies heute nicht mehr gerechtfertigt, weil sich viele Überlagerungen zeigen ( S t a u d i n g e r , 67), und der

Unterschied in der Wirkung auf verschiedene Gewebe in erster Linie ein quantitativer ist (V e r z a r , 77). (Siehe hierzu auch S. 1.)

Das breite Wirkungsspektrum der Corticoide auf die gesamten Stoffwechselvorgänge kann nur damit erklärt werden, daß der eigentliche Angriffspunkt der Hormone an einer zentralen Stelle des Stoffwechselgeschehens, also im Zellstoffwechsel bzw. an Fermentsystemen liegt. Da aber dieser zentrale Angriffspunkt nicht genau bekannt ist, muß man sich mit der meist unbefriedigenden Aufzählung der Einzelleistungen begnügen, wobei oft nicht unterschieden werden kann zwischen primärer Beeinflussung des Stoffwechsels und daraus entstehender sekundärer Wirkung.

Bei der Forschung über die Leistungen der Corticoide kann man, wie bei allen Hormonen, prinzipiell zwei Wege einschlagen. Einmal kann man die Ausfallerscheinungen bei Hypofunktion bzw. Afunktion der NNR beobachten, die durch Entfernung der hormonbildenden Drüsen erreicht werden kann oder bei entsprechenden Krankheiten (z.B. Addisonsche Krankheit des Menschen) auftritt. Zum anderen können die Erscheinungen bei Hyperfunktion der NNR herangezogen werden, die durch entsprechende Hormongaben, entweder in Form von Nebennierenextrakten, oder, wie heute meist üblich, in Form von synthetisch hergestellten Corticoiden (11-Desoxycorticosteron = Cortexon = DOC, dessen Azetat = DOCA, 17-Oxy-11-dehydrocorticosteron = Cortison u.a.m.) erzielt wird, oder durch bestimmte Krankheiten (NNR-Tumoren usw.) ausgelöst werden kann.

Bei Adrenalektomie zeigt sich eine Störung im Mineralstoffwechsel in der Weise, daß das Verhältnis Na:K gestört ist, und zwar dadurch, daß Natrium- und Chlorionen vermehrt ausgeschieden werden, wodurch der NaCl- und NaHCO<sub>3</sub>-Gehalt des Blutes abnimmt (Neigung zu Acidosis). Es kommt gleichzeitig zur Kaliumretention, die im Extremfalle zu einer Kaliumintoxikation führen kann. Auch wird das Na:K-Verhältnis durch Elektrolytverschiebungen zwischen Blutplasma und Gewebe weiterhin negativ beeinflußt.

Diedabei auftretenden Störungen im Wasserhaushalt können zum Teil durch diese Erscheinungen und weiterhin durch veränderte osmotische Druckverhältnisse infolge gleichzeitig auftretender Störungen im Kohlenhydratstoffwechsel oder durch fehlerhafte Nierentätigkeit (verminderte Wasserausscheidung) verursacht sein.

Im Kohlenhydratstoffwechsel fällt auf, daß trotz erhöhten Abbaues der Glykogenvorräte in Leber und quergestreifter Muskulatur Hypoglykämie auftritt,

und zwar, weil die Neubildung von Kohlehydraten aus Fetten und Eiweiß vermindert ist.

Auch im Eiweiß- und Fettstoffwechsel treten durch die Wirkung der NNR-Hormone Veränderungen ein. Nach Verabreichung von ACTH erfolgt z.B. vermehrte Stickstoffausscheidung im Harn. Im einzelnen sind diese hierdurch ausgelösten Veränderungen in den Stoffwechselabläufen aber noch nicht bekannt.

Die bei Hypofunktion der NNR auftretenden Störungen im Blutkreislauf sind zum Teil durch die oben beschriebenen Stoffwechselveränderungen zu erklären. Gestört ist außerdem die Permeabilität der Kapillaren, die atonisch erweitert sind, wodurch eine Erniedrigung des Blutdruckes und eine Herabsetzung des Schlag- und Minutenvolumens des Herzens erfolgt.

Im Hinblick auf die Beziehungen der NNR zu den endokrinen Drüsen, findet sich bei Ausfall der Rindenfunktion eine deutlich ausgeprägte Herabsetzung der Genitalfunktion, ebenfalls der Laktation, die nur teilweise durch den veränderten Stoffwechsel anorganischer und organischer Substanzen erklärt werden kann. Die Symptome bei pathologischer Hyperfunktion der NNR (z.B. NNR-Tumoren), wie sie beim Menschen öfter vorkommt, werden in erster Linie durch die androgen wirkenden NNR-Hormone hervorgerufen (Virilismus).

Auf die Möglichkeiten einer Therapie mit NNR-Hormonen (bes. mit synthetisch hergestellten Hormonen, wie Cortison u.ä.), die vor allem in der Humanmedizin schon weitgehend bearbeitet wurde und bei den verschiedensten Krankheitsbildern mit Erfolg angewandt wird, kann hier nicht näher eingegangen werden.

#### D) Bestimmung der Nebennierenrindenhormone und deren Abbauprodukte

Die Bestimmung der NNR-Hormone und deren Abbauprodukte kann in allen Körperflüssigkeiten durchgeführt werden. Doch ist nur die im Harn vorliegende Menge so groß, daß eine Gehaltsermittlung ohne besonderen Aufwand exakt durchgeführt werden kann.

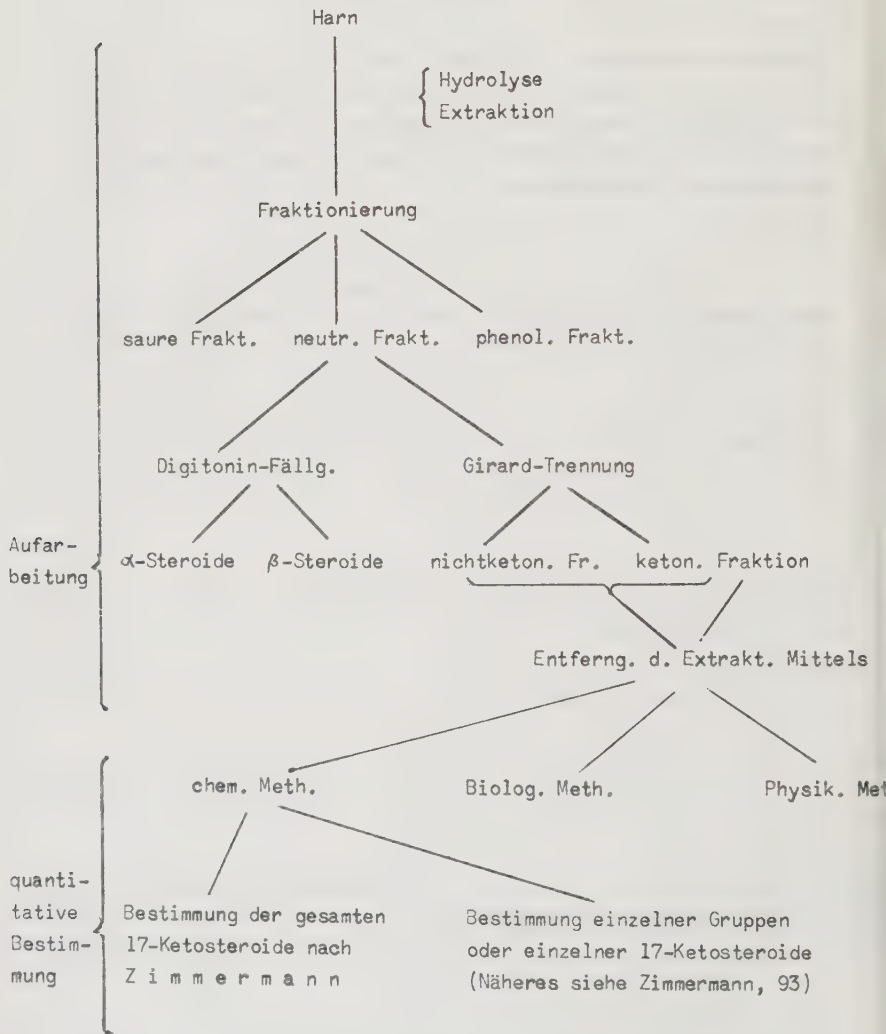
Die von der NNR sezernierten Hormone, die reduzierenden C<sub>21</sub>-Steroide, kommen dabei nur in verhältnismäßig sehr geringer Menge im Harn vor (siehe S. 6 - 8) und sind chemisch sehr labil, so daß ihrer Bestimmung große methodi-

sche Schwierigkeiten entgegenstehen (Prinzip ihrer Bestimmung auf S. 20). Im Harn liegen als Abbauprodukte der NNR sowie teilweise der Testes (Dehydroisoandrosteron, Isoandrosteron, Androsteron, Adrenosteron u.a.) die neutralen 17-Ketosteroide vor; diese werden um den Funktionszustand der Nebennierenrinde zu erfassen, zur Bestimmung herangezogen.

Die Bestimmungsverfahren der 17-Ketosteroide lassen sich jedoch nicht auf den nativen Harn anwenden, da dieser zu viel Beimengungen enthält, die die Reaktion stören würden. Deshalb muß der eigentlichen quantitativen Bestimmung zunächst eine Aufarbeitung der Proben vorangehen mit dem Ziel der Anreicherung der zu bestimmenden Steroide und der Entfernung störender Begleitstoffe.

Im Folgenden ist deshalb zuerst die Aufarbeitung des Harnes und im Anschluß daran die eigentliche chemische Bestimmung der 17-Ketosteroide geschildert.

Möglichkeiten zur Aufarbeitung und Bestimmung der neutralen 17-Ketosteroide im Harn.



## I. Aufarbeitung des Harns

### 1. Gewinnung des Harns

Grundsätzlich muß die gesamte Harnmenge von 24, 48 oder 72 Stunden zur Bestimmung vorliegen. Die Werte sind hier am konstantesten, zumal die tagesrhythmischen Schwankungen ausgeglichen werden. Beim Menschen ist die vollständige Sammlung des Harns verhältnismäßig einfach (als Kontrolle für eine vollständige Harnmenge empfiehlt Zimmermann (93) die Bestimmung des spezifischen Gewichtes). Beim Tier dagegen ergeben sich größere Schwierigkeiten und Fehlerquellen (siehe S.25).

Um einen Abbau der Steroide im Harn durch Bakterien zu vermeiden, werden verschiedene Konservierungsmöglichkeiten angegeben, die jedoch nicht befriedigen: Aufbewahrung im Kühlschrank, Zusätze von Eisessig, Salzsäure, Toluol, Phenol, Chloroform u.a. (siehe S. 44).

Aus der gut durchmischten Gesamtmenge wird jeweils nur ein aliquoter Teil weiter verarbeitet, der Gehalt an NNR-Hormonen bestimmt und auf die Gesamtharnmenge bezogen.

### 2. Hydrolyse

Die Steroidhormone liegen im Harn z.T. als wasserlösliche Glucuronide, z.T. als Schwefelsäureester vor. Um sie mit einem, mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel, wie Äther, Chloroform usw. (siehe später), extrahieren zu können, müssen sie zuerst hydrolysiert werden. Die Art der Hydrolyse richtet sich nach der Stabilität der zu bestimmenden Hormone.

a) Hydrolyse durch Kochen (Erhitzung auf 90-100°C) mit starken Säuren (pH = 0,3 - 0,5) während 15 - 30 Minuten.

---

Diese Art der Hydrolyse darf nur bei sehr stabilen Verbindungen angewandt werden: phenolische Steroide, neutrale 17-Ketosteroide, Corticoide ohne 17-OH-Gruppe. Es entstehen hierbei immer stark gefärbte Kunstprodukte, die die Ergebnisse beeinflussen können (Callow, 11), Callow, Emmens a. Stroud, 12), Zimmermann, 93) u.a.).

b) Hydrolyse durch Ansäuern ( $\text{pH} = 1$  oder  $\text{pH} = 4$ ) bei Zimmertemperatur.

Diese schonende Hydrolyse eignet sich vor allem für Corticoide, jedoch ist die Ausbeute meist nicht vollständig, da in erster Linie nur Schwefelsäureester gespalten werden. (H e a r d , S o b e l u. V e n n i n g , 27 , P f e f f e r u. S t a u d i n g e r , 51).

c) Hydrolyse mit Hilfe von Fermenten (Glucuronidasen, Sulfatasen)

In letzter Zeit versucht man, mit Hilfe von Glucuronidasen (aus Kälbermilz) die Glucuronide und mit Hilfe von Sulfatasen die Schwefelsäureester zu spalten.

(B ü h l e r u. Mitarb. (8), C o h e n (13), Z i m m e r m a n n (93), S t i t c h u. H a l k e r s t o n (71), S t a u d i n g e r u. B a u e r (68) u.a.).

### 3. Extraktion

An die Hydrolyse schließt sich die Extraktion der Steroide mit Hilfe eines organischen Lösungsmittels an.

Als Lösungsmittel werden verwendet: Äther (am besten für 17-Ketosteroide), Chloroform (meist für Corticoide), Äthylendichlorid, Methylendichlorid, Xylol, Tetrachlorkohlenstoff, Petroläther u.a.m. Auch Gemische verschiedener Lösungsmittel werden empfohlen (siehe hierzu Z i m m e r m a n n , 93).

Sämtliche Lösungsmittel müssen vor Gebrauch frisch destilliert werden zwecks Entfernung störender Verunreinigungen (z.B. Peroxyde mit oxydativer Wirkung). Die Menge des Lösungsmittels wird am besten so gewählt, daß sie größer ist als die Menge des Harnhydrolysates.

Zur Extraktion können entsprechende Apparate benutzt werden. Es hat sich aber am besten die einfache Ausschüttelung der Harnprobe im Scheidetrichter mit der Hand durchgesetzt, wobei das Extraktionsmittel ca. 2 - 3 mal erneuert wird. Auch kann die Extraktion gleichzeitig mit der Hydrolyse durchgeführt werden.

### 4. Fraktionierung

In dem Harnextrakt liegen sämtliche Harnbestandteile vor, die nach

Hydrolyse in organischen Lösungsmitteln löslich sind. Um nun die Steroidhormone von den übrigen Harnbestandteilen abzutrennen, bzw. um einzelne Gruppen der Steroidhormone zu erfassen, ist eine weitere Fraktionierung und Reinigung erforderlich. Die Art der Fraktionierung wird je nach der gesuchten Steroidhormongruppe verschieden sein. Hier soll nur ein kurzer Überblick über die verschiedenen Fraktionierungen gegeben werden mit besonderer Berücksichtigung derjenigen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden (Fraktionierung a) und b).

a) Trennung in saure, neutrale und phenolische Anteile

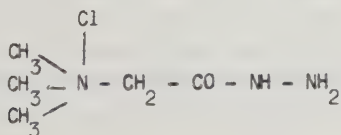
Durch Waschen des Harnextraktes mit Natriumbikarbonatlösung (gesättigt) werden die sauren Anteile (organische Säuren, verschiedene nicht näher differenzierte Farbstoffe) entfernt. Durch weiteres Ausschütteln mit Natronlauge (1 %ig bis 10 %ig oder festes Natriumhydroxyd) und anschließendes Waschen mit destilliertem Wasser werden sämtliche Stoffe mit phenolischen Hydroxylgruppen, die alle in der Natronlauge löslich sind (Phenolische Steroide, wie z.B. alle Östrogene, verschiedene Chromogene), abgetrennt. Sie können nach entsprechender Vorbereitung aus der Waschflüssigkeit wieder mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert werden (Zimmerrmann, 93; Abelin, 2 u.a.). In dem Extraktionsmittel bleiben somit die neutralen 17-Ketosteroide (Androsteron, Dehydroisoandrosteron u.a.) und die neutralen alkoholischen Steroide (Pregnandiol u.a.) sowie verschiedene nicht näher differenzierte, in Äther lösliche Verbindungen zurück.

b) Trennung der neutralen Steroide in ketonische und nichtketonische Anteile

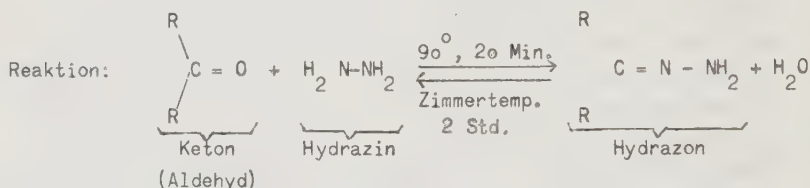
Mit Hilfe der von Girard und Sandulesco (25) gefundenen Methode können diejenigen neutralen Steroide, die eine Keto-Gruppe am C-Atom 3, 17 oder 20 besitzen, abgetrennt werden.

Das Prinzip ist folgendes:

Das Girard-Reagens T (Trimethylacetylhydrazidammoniumchlorid),



das eine Hydrazingruppe trägt, bildet mit der jeweiligen Ketogruppe der neutralen Steroide in stark saurem Milieu (Eisessig) und bei einer Temperatur von ca. 90° C ein wasserlösliches Hydrazon (quantitativ nach einer Reaktionszeit von ca. 20 Min.), das durch Ausschüttelung von den in organischen Lösungsmitteln löslichen, aber wasserunlöslichen Substanzen abgetrennt werden kann. Durch anschließende Hydrolyse (am besten mit Salzsäure bei Zimmertemperatur, ca. 2 Std.) werden diese Hydrazone wieder gespalten, und die neutralen ketonischen Steroide, die wieder durch die Hydrolyse in die freie, wasserunlösliche Form überführt worden sind, können mit einem organischen Lösungsmittel aus der wässrigen Phase extrahiert werden.



Das Girard-Verfahren hat in erster Linie den Zweck ~~der~~ Entfernung von Chromogenen (Chromogene ohne Ketogruppen), die bei den eigentlichen colorimetrischen Bestimmungsverfahren die Ergebnisse stören, weniger den Zweck der getrennten Verarbeitung der ketogruppentragenden Fraktion, da ja dies dann keine Rolle spielt, wenn bei der Bestimmung ein Reagens benützt wird, das sowieso nur die ketonischen Steroide erfaßt. Bestimmt man colorimetrisch Ketosteroide mit und ohne Girard-Reinigung, so liegen die Ergebnisse bei der Bestimmung ohne Girard-Verfahren wesentlich höher; die Differenz beider Ergebnisse entspricht also den störenden Farbstoffen ohne Ketogruppen (S. 20). Die Absorptionskurven von Harnextrakten nach Girard-Reinigung (bestimmt mit Hilfe der m-Dinitrobenzolreaktion nach Zimmermann) sind denjenigen bei reinen kristallisierten Hormonen sehr ähnlich. (Reichstein (58), Zimmermann, Anton und Pontius (94), Dobriner, Lieberman a. Rhoads (18), Callow, Callow a. Emmens (10), Weissbecker (81)).

Weitere Möglichkeiten zur Entfernung der störenden Harnfarbstoffe werden in einem eigenen Kapitel besprochen (siehe S. 20).

c) Trennung der neutralen Steroide in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Steroide.

$\alpha$ -Steroide (Cholesteron, Dehydroisoandrosteron u.a.) bilden mit Digintonin schwer lösliche Molekülverbindungen, die ausfallen, und so abgetrennt werden können; die  $\beta$ -Steroide (Androsteron u.a.) bleiben hierbei in Lösung.

Durch diese Fraktionierung soll eine Trennung der Steroide nach ihrer Herkunft möglich sein, da man annimmt, daß sämtliche  $\beta$ -Steroide aus dem Stoffwechsel der NNR, die  $\alpha$ -Steroide auch aus dem der Geschlechtsdrüsen stammen (A b e l i n (2), F r a m e (22) ).

d) Weitere Trennungsmethoden der Steroide

Fraktionierungen der Steroidhormone sind auch mit Hilfe der Papierchromatographie, Säulenchromatographie, Papierelektrophorese und Gegenstromverteilung möglich und beschrieben worden (siehe Z i m m e r m a n n , 93).

5. Entfernung des Extraktionsmittels

Zuletzt befindet sich, je nach der angewandten Fraktionierung, eine bestimmte Gruppe der Steroidhormone in dem Extraktionsmittel. Dieses wird durch Destillation entfernt, so daß die Steroide im trockenen Rückstand verbleiben. Hier schließt sich nun die eigentliche quantitative Bestimmung (siehe S. 17 ff.) an.

II. Quantitative Bestimmung des Harnextraktes.

1. Biologische Methoden

Die biologischen Nachweismethoden sind die ältesten Hormonbestimmungsverfahren. Es werden damit nur die biologisch aktiven Komponenten erfaßt. Dies geschieht in der Weise, daß Versuchstieren (Ratte, Maus, Hahn usw.) Hormonextrakt verabreicht wird, worauf nach einiger Zeit spezifische Veränderungen im gesamten Stoffwechsel oder an bestimmten Organen auftreten (Überlebenstest, Glykogenspeicherungstest, Hahnenkammtest, Vesiculardrüsentest usw.), die gemessen werden können.

( Moore, Gallagher u. Koch (47, 48), Loewe u. Voss (42), Allen u. Doisy (3) u.a.). Je nach der angewandten Methode wurden die verschiedensten Hormoneinheiten festgelegt. Da diese Verfahren aber sehr zeitraubend, kostspielig und mit einer großen Fehlerbreite behaftet sind, werden sie heute vielfach nur mehr für qualitative Bestimmungen angewendet.

## 2. Physikalische Methoden.

Es gibt eine Reihe physikalischer Methoden, wie Polarographie, Ultra-rot- und Ultraviolettspektrographie, auf die hier nicht näher eingegangen werden kann.

## 3. Chemische (colorimetrische) Methoden.

In diesem Kapitel soll nur auf die chemische Bestimmung der zum großen Teil aus der NNR stammenden Produkte, also der neutralen 17-Ketosteroide und der in sehr geringer Menge vorliegenden Corticoide, eingegangen werden.

### a) Bestimmung der neutralen 17-Ketosteroide

In den nach dem oben beschriebenen Verfahren aufgearbeiteten Harnproben können mit der m-Dinitrobenzolreaktion nach Z i m m e r m a n n (84 - 93) alle ätherlöslichen, neutralen, ketogruppentragenden Verbindungen erfaßt werden. Dies sind in erster Linie die neutralen 17-Ketosteroide (Androsteron, Dehydroisoandrosteron, Isoandrosteron), außerdem neutrale 3-Ketosteroide (Adrenosteron u.a.), die jedoch nach Z i m m e r m a n n (93) vor der colorimetrischen Messung entfernt werden können (siehe S. 19 und S. 21), sowie nicht näher differenzierte chromogene Stoffe.

Da in der vorliegenden Arbeit diese Methode nach Z i m m e r m a n n angewandt wurde, soll in diesem Zusammenhang näher darauf eingegangen werden.



Prinzip: m-Dinitrobenzol c1cc([N+](=O)[O-])ccc1[N+](=O)[O-] gibt in alkalischem Milieu mit ketogruppenhaltigen Steroidhormonen eine violettrote Farbe. Der Reaktionsmechanismus ist noch nicht geklärt. Eine Möglichkeit besteht darin, daß durch schwache Reduktionswirkung der Ketogruppe aus m-Dinitrobenzol ein farbiges Zwischenprodukt entsteht, denn bei starker

Reduktion des m-Dinitrobenzols bildet sich in alkalischem Milieu über verschiedene Zwischenstufen Anilin (F i e s e r u. F i e s e r, 21). Die zweite Möglichkeit wird darin gesehen, daß durch Anlagerung der bei der Reaktion vorhandenen Lauge an das m-Dinitrobenzol eine Verbindung entsteht, deren Kondensation mit dem Ketosteroid den typischen Farbkomplex bildet (Z i m m e r m a n n, 93).

Die Bestimmung wird im Prinzip so durchgeführt, daß zu der alkoholischen Lösung des Harnextraktes gleiche Mengen von Kalilauge und alkoholischer m-Dinitrobenzollösung gegeben werden. Gleichzeitig wird ein Blindwert angesetzt, bei dem die alkoholische Hormonlösung durch reinen Alkohol ersetzt wird. Die Proben bleiben dann eine bestimmte Zeit bei konstanter Temperatur im Dunkeln stehen, werden anschließend mit einem organischen Lösungsmittel ausgeschüttelt (wobei sich unspezifische gelbbraune Farbkomplexe der 3-Ketosteroide und weitere Chromogene, die spezifisch schwerer sind, absetzen sollen - siehe S. 20) und gegeneinander colorimetrisch gemessen. Die Reaktion ist abhängig von der Konzentration der m-Dinitrobenzollösung und derjenigen der Kalilauge, von der Reaktionszeit, der Temperatur, der Belichtung, der Art des Lösungsmittels des Harnextraktes und der Ausschüttelungsflüssigkeit. Nach vielen eingehenden Untersuchungen wurden von Z i m m e r m a n n optimale Reaktionsbedingungen festgestellt, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden (siehe "Eigene Untersuchungen", S. 32). Zahlreiche Modifikationen sind von anderen Autoren (C a l l o w, C a l l o w a. E m m e n s, 10; H ö l t d o r f f a. K o c h, 33) vor allem in England und Amerika entwickelt worden, wobei aber lediglich die Reaktionsbedingungen variieren, während das Prinzip der Methode stets erhalten bleibt.

Für die Bestimmung einzelner neutraler 17-Ketosteroide gibt es die verschiedensten colorimetrischen Verfahren, je nach der zu erfassenden funktionellen Gruppe; so können zum Beispiel Dehydroisoandrosteron, das ausschließlich aus dem Stoffwechsel der NNR stammen soll, mit konz. Schwefelsäure (A l l e n, H a y w a r d u. Mitarb. (4), D i r s c h e r l u. T r a u t (15), D i r s c h e r l u. Z i l l i k e n (16, 17)), Androsteron und Isoandrosteron nach der Reaktion von P i n c u s (53) mit essigsaurer Antimontrichloridlösung bestimmt werden.

b) Bestimmung der Corticoide (C<sub>21</sub>-Steroide)

Da die Corticoide nur in ganz geringen Mengen im Harn vorkommen und sehr labil sind, entstehen große methodische Schwierigkeiten. Manche Autoren (Zimmermann (93) u.a.) kommen daher zu dem Schluß, daß die chemischen Corticoidbestimmungen noch ungenügend sind. - Die C<sub>21</sub>-Steroide besitzen alle, wie schon oben erwähnt, am C-Atom 17 die aktive Ketolseitenkette  $-\text{CO}-\text{CH}_2\text{OH}$ . Auf der Erfassung dieser Gruppe beruhen die verschiedenen Bestimmungsmöglichkeiten, die im Prinzip kurz folgende sind:

Durch Oxydation der Ketolseitenkette wird bei stärkerer Oxydation (mit Überjodsäure) aus der Ketolseitenkette Formaldehyd abgespalten, das mit Chromotropsäure quantitativ bestimmt werden kann; bei milder Oxydation (mit Natriumwismutat) werden diejenigen Corticoide, die am C-Atom 17 eine Hydroxylgruppe tragen, in 17-Ketosteroide übergeführt. Auf Grund der reduzierenden Wirkung der  $-\text{CO}-\text{CH}_2\text{OH}$ -Gruppe können verschiedene Reagentien, wie Phosphormolybdänsäure, Ferricyanidlösung u.ä., spezifisch reduziert werden. Eine weitere Bestimmungsmöglichkeit beruht darauf, daß die C<sub>21</sub>-Steroide, genau wie die Zucker, mit Phenylhydrazin unter Phenylhydrazonbildung eine charakteristische gelbe Farbe bilden (Porter Silber-Reaktion). Außerdem können die Corticoide, ähnlich wie die 17-Ketosteroide, mit den verschiedenen biologischen und physikalischen Methoden bestimmt werden.

III. Möglichkeiten der Entfernung störender Harnfarbstoffe

Bei allen colorimetrischen Bestimmungsverfahren, mit deren Hilfe Stoffe aus dem Harn erfaßt werden sollen, treten Störungen der Ergebnisse durch im Harn vorkommende oder erst während des Arbeitens entstehende Farbstoffe auf. Um diese verhältnismäßig große Fehlerquelle auszuschalten, wurden verschiedene Möglichkeiten entwickelt. Die Entfernung der Chromogene kann bereits vor der Hydrolyse, während der Fraktionierung oder erst kurz vor bzw. während der eigentlichen colorimetrischen Messung erfolgen.

### 1) Entfernung vor der Hydrolyse

Zusatz von 10 %iger Kupfersulfatlösung zum Harn soll die Chromogene zum Teil beseitigen (Näheres siehe Z i m m e r m a n n (93) ).

### 2) Entfernung während der Fraktionierung

Durch Ausschüttelung mit Natriumbikarbonatlösung und Natronlauge bzw. Natriumhydroxyd bei der Trennung in saure, neutrale und phenolische Anteile werden die Chromogene teilweise entfernt. Die beste Möglichkeit zur Entfernung der störenden Harnpigmente ist die Anwendung der G i r a r d -Reinigung (siehe S. 29).

### 3) Entfernung kurz vor der colorimetrischen Messung

(bei der m-Dinitrobenzolreaktion nach Z i m m e r m a n n )

Sie wird so gehandhabt, daß die Proben direkt vor der Messung mit Äther ( Z i m m e r m a n n , 93), Benzol ( W a l t e r , 79) o.ä. ausgeschüttelt werden, wobei störende Verbindungen wie 3-Ketosteroide u.a. nicht näher bestimmte chromogene Stoffe in dem Extraktionsmittel nicht löslich sein sollen (siehe auch S.18).

### 4) Entfernung während der colorimetrischen Messung

Sie kann entweder durch Differenzmessung oder durch Messung in zwei Spektralbereichen und anschließender rechnerischer Eliminierung durchgeführt werden (Näheres hierzu siehe Z i m m e r m a n n (93) ).

## Eigene Untersuchungen

### Arbeitsplan:

Aus dem Dargelegten ist zu entnehmen, daß unter Zugrundelegung der heutigen Kenntnisse von der NNR-Funktion und deren Aktivitätsbestimmung die Ermittlung der im Harn zur Exkretion kommenden 17-Ketosteroide immer noch gerechtfertigt ist.

Von den Tieren sind bisher Normalwerte vom Hausschwein bekanntgeworden ( S c h m i t t , 64). Beim Rinde haben nur H o l c o m b e (32) und M e s c h a k s (46) NNR-Aktivitätsbestimmungen mit Hilfe der 17-Ketosteroidbestimmungen durchgeführt. Allerdings befassen sich diese Autoren

mit pathologischen Fällen und haben nur einige wenige Normalwerte mitgeteilt. Hierzu kommen noch methodische Bedenken.

Entsprechend der Bedeutung der NNR-Tätigkeit, insbesondere für verschiedene Rinderkrankheiten, ist es erforderlich, Normalwerte zu ermitteln und die dabei anzuwendenden Untersuchungsverfahren einer Kritik zu unterziehen. Zu diesem Zwecke sollen die Ausscheidungswerte an einer kleineren Tierzahl (5 Bullen, 4 Kühe und 5 Kälber), dafür aber mit entsprechender Gründlichkeit und oftmaliger Wiederholung bestimmt werden. Hierbei werden bei allen Tieren die gesamten neutral reagierenden 17-Ketosteroide gemessen und zusätzlich bei den Bullen die mit dem Girard-Reagenz gereinigten 17-Ketosteroide.

### III. VERSUCHSTIERE

In der vorliegenden Arbeit wurden 5 Bullen, 4 Kühe und 5 Kälber untersucht. - Alle Bullen und das Rind Nr. II wurden uns für die Versuche freundlicherweise vom Institut für Geburtshilfe und Klinik zur Behandlung von Außenfällen zur Verfügung gestellt, die übrigen Kühe und die Kälber stammten aus dem eigenen Institut. Ein Teil dieser Tiere stand während der Zeit der Untersuchungen in Fütterungsversuchen, die jedoch den normalen, physiologischen Ablauf der Lebensvorgänge nicht beeinträchtigten. So wurde an Kuh Nr. III und Kuh Nr. IV zusätzlich zu Rübenschnitzeln und Heu mit Benzin extrahiertes Sojaschrot in steigenden Mengen von 1 - 2 kg je Tier und Tag verfüttert. Die Kälber (außer Kalb e) wurden mit Milchersatzfutter aufgezogen, außerdem mit Kraftfutter in Anlehnung an den DLG-Kälbernährmehlstandard und ab der 3. Woche zusätzlich mit Heu.

1. Bulle A Höhenfleckvieh, 3 Jahre alt, Besamungsbulle mit guter Befruchtungsfähigkeit.
2. Bulle B Höhenfleckvieh, ca. 14 Mon. alt, typlos, Deckunlust (evtl. noch zu jung)
  1. Untersuchungsperiode
  2. Untersuchungsperiode 13 Tage nach Gabe von 20 ccm (= 1 Mill.E) "Foragynol stark", das auf die Ketosteroidwerte jedoch keinen Einfluß hatte.
3. Bulle C Höhenfleckvieh, 1 1/2 Jahre alt, typlos.
4. Bulle D Höhenfleckvieh, 5 Jahre alt, guter Besamungsbulle (regelmäßige 2 mal wöchentliche Absamung), 2 Untersuchungsserien.
5. Bulle E Höhenfleckvieh, 4 Jahre alt, Untersuchung 2 Monate nach Gabe von 20 ccm (= 1 Mill.E) "Foragynol stark"  
Dieses Präparat beeinträchtigte die normalen Ketosteroidwerte jedoch nicht.
6. Kuh I Kreuzung rotbuntes Niederungsvieh - Höhenfleckvieh, 5 Jahre alt, nicht trächtig.

7. Kuh II Simmentaler-Rind, 4 1/2 Jahre alt, nicht trächtig.
8. Kuh III Höhenfleckvieh, 15 Jahre alt, nicht trächtig.
9. Kuh IV Höhenfleckvieh, 12 Jahre alt, nicht trächtig.
10. Kalb a Stierkalb, Graubr. Höhenvieh, ca. 3 Wochen alt, im Verlauf des Versuches zunehmender schleimig-stinkender Durchfall.
11. Kalb b Kuhkalb, Graubr. Höhenvieh, ca. 4 Wochen alt.
12. Kalb c Stierkalb, Graubr. Höhenvieh, ca. 5 Wochen alt, sehr kräftig.
13. Kalb d Stierkalb, Graubr. Höhenvieh, ca. 5 1/2 Wochen alt, Zwillling.
14. Kalb e Stierkalb, Höhenfleckvieh, ca. 7 Wochen alt.

#### IV. METHODIK

In diesem Kapitel soll lediglich das rein methodische Arbeiten beschrieben und nicht auf das Prinzip der angewandten Methoden eingegangen werden, da dies im Abschnitt "Literatur" bereits getan wurde.

##### A) Gewinnung des Harnes

Wie schon bei der Erörterung des einschlägigen Schrifttums zum Ausdruck gebracht, erhält man die charakteristischsten Werte, wenn man bei der Bestimmung von der 24-Std.-Harnmenge ausgeht, weil dadurch tagesrhythmische Schwankungen ausgeglichen werden. Hierzu ist es wichtig, daß diese 24-Std.-Menge vollständig gewonnen werden kann.

Die Vorrichtungen zum Auffangen des Harnes müssen bei Bullen und Kühen, den anatomischen Verhältnissen entsprechend, verschieden konstruiert werden. Die Kälber bringt man für die Dauer des Versuches in einen Stoffwechsellkäfig.

Bei Bullen geht man am besten folgendermaßen vor: Ein trichterförmiger Gummibeutel wird mit Hilfe von Gurten so am Präputium fixiert, daß er sich beim Legen oder Aufstehen des Tieres nicht verschiebt. Am spitz zulaufenden, ventral des Präputiums befindlichen Ende dieses Gummibeutels ist ein Gartenschlauch befestigt, der durch eine Öffnung im Fußboden in ein darunter gelegenes, 25 Liter fassendes Steingutgefäß mündet. Die Länge des Schlauches ist so bemessen, daß sich das Tier frei im Stand bewegen kann, ohne daß der Schlauch aus dem Gefäß gleiten kann. Es ist zu empfehlen, den Sitz des Urinals während der 24 Stunden oft zu überprüfen.

Bei den Kühen wird ein Gummischlauch von ca. 20 cm Durchmesser ebenfalls mit Hilfe von Gurten um Bauch und Brust an der Scheide befestigt. Dieser mündet in ein Gefäß (25-ltr.-Steingutgefäß mit Zapfhahn), das ca. 1 m hinter dem Tier bzw. hinter dem Stand aufgestellt ist.

Die Kälber werden in einen Stoffwechsellkäfig gebracht. Dieser ist so groß, daß jüngere Kälber verhältnismäßig gute Bewegungsfreiheit haben. Die Tiere stehen auf einem Drahtrost, durch den Faeces und der Harn durchfallen können. Auf einem darunter befindlichen Maschendraht ist der Kot zu

sammeln, während der Urin durch einen unter dem Rost befindlichen Metalltrichter in ein Gefäß ablaufen kann. Diesem Gefäß ist ein Sieb mit Watte aufgesetzt, das den Harn vor Verunreinigungen mit Kot und Futterresten schützt.

Nach jeweils 24 Std. (jeweils etwa 9 Uhr morgens) werden die Gefäße gewechselt. Dem Harn wurden während der 24 Std. keine Konservierungsmittel zugesetzt, da sich verschiedene von uns versuchte Methoden nicht bewährten (siehe S. 44).

## B) Vorbereitende Arbeiten

### I. Bestimmung der Harnmenge

Das Gefäß mit der 24-Std.-Harnmenge wird gut durchmischt, um die Homogenität der Harnportionen während 24 Std. sicherzustellen. Nun wird der Harn durch den am Gefäß angebrachten Zapfhahn literweise in einen 1000-ml-Meßzylinder abgefüllt, und so seine Menge bestimmt. Dabei werden von ca. jedem zweiten Liter 10 - 20 ccm Harn in ein bereitgestelltes Gefäß filtriert, so daß zuletzt ca. 200 ccm filtrierter Harn vorliegen. Außerdem werden noch ca. 1 ltr. des unfiltrierten Harnes in einem weiteren Gefäß zur Sicherheit aufbewahrt. Der übrige Harn kann verworfen werden.

### II. Bestimmung des spezifischen Gewichtes

Das spez. Gewicht wird mit Hilfe eines Aräometers (es empfiehlt sich ein Normalaräometer von

1.000 bis 1.100 in möglichst großem Maßstab)

im Anschluß an die Harnabnahme bestimmt. Es ist ebenso wie die 24-Std.-Harnportion, für die ausgeschiedene Hormonmenge von großer Bedeutung (siehe S.44 und S. 48).

### III. Destillation des Äthers

Der Äther darf nur in peroxydfreiem Zustande zur Extraktion benützt werden. Er muß deshalb zur Entfernung der Peroxyde 2 - 4 mal destilliert werden, wobei ca. 100 ccm Vorlauf und ebenfalls ca. 100 ccm Rückstand zu verworfen sind. Nach ca. zweimaligem Destillieren wird erstmalig eine Probe auf Peroxyde durchgeführt: ca. 10 ccm des zu prüfenden Äthers werden mit einigen Tropfen Salzsäure angesäuert, dazu einige Kristalle Kaliumjodid p.A. gegeben und gemischt. Bei Anwesenheit von Peroxyden tritt sofort eine gelbe Farbe auf (Oxydation des J- zu elem.J). Ist dies der Fall, so muß der Äther noch weiter so oft destilliert werden, bis die Probe für kurze Zeit (ca. 1 Min.) farblos bleibt.

### C) Aufarbeitung des Harnes

I. Aufarbeitung zur Bestimmung der "ungereinigten" 17-Ketosteroide  
(= 17-Ketosteroide ohne Anwendung der Girard-Reinigung).

#### 1. Reagentien

Salzsäure, p.A., konz.

Äther, peroxydfrei

Natriumbicarbonatlösung, gesättigt

Natronlauge, 1 n

#### 2. Hydrolyse (siehe auch S.13)

Mit einer Vollpipette werden 50 ccm des filtrierte Harns in einen 250 ccm fassenden Schliffkolben pipettiert und 5 ccm konz. Salzsäure hinzugegeben. Zur Hydrolyse, welche die Spaltung der Glucuron- und Schwefelsäureester der Steroide bezweckt, wird die Probe unter Rückfluß 15 Min. (von Beginn des Kochens an gerechnet) gekocht. Nach dem Abkühlen wird die nun dunkelrotbraun gefärbte Flüssigkeit quantitativ in einen 250 ccm fassenden Scheidetrichter übergeführt.

#### 3. Extraktion (siehe auch S. 14)

Zum Harnhydrolysat werden 50 ccm Äther gegeben und 5 Min. kräftig geschüttelt. Besonderer Wert ist auf intensives Schütteln zu legen, da hiervon die Quantität der Hormonausbeute abhängig ist. Danach läßt man die Probe ca. 5 Min. ruhig stehen (evtl. kann man den Trichter in leicht rotierende Bewegung versetzen).

Dabei tritt meist eine deutliche Schichtung in die schwerere, wässrige, gelbbraune Harnphase und in die darüberbefindliche, leichtere, rotbraune Ätherphase auf. Die gelbbraune Harnschicht wird nun in einen zweiten 250 ccm fassenden Scheidetrichter abgelassen, mit 25 ccm Äther versetzt und nochmals 5 Min. kräftig geschüttelt. Nach ca. 3 - 5 Min. Stehenlassen tritt wieder eine Trennung zwischen der nun heller rotbraun gefärbten Äther- und gelbbraunen Harnschicht auf. Die Harnphase wird abgelassen und verworfen. (In hinreichenden Vorversuchen hat sich die zweimalige Ätherausschüttelung als erschöpfende Extraktion erwiesen). Dabei ist unbedingt zu beachten, daß keinesfalls Äther in Verlust gerät; unvollständig getrennte Grenzschichten bleiben im Scheidetrichter. Die beiden Ätherphasen werden nun in einem Schütteltrichter quantitativ

vereinigt. (Der leere Schütteltrichter wird am besten mit den zur folgenden Fraktionierung erforderlichen Lösungen, mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und 1n  $\text{NaOH}$ , nachgespült).

Manchmal bilden sich, vor allem bei der ersten Ätherausschüttelung, Emulsionen, die sich oft erst nach längerem Absitzen (bis zu 1 Std.) oder überhaupt nicht trennen. Man verfährt dabei am besten so, daß ca. 20 ccm 10 %ige Natronlauge zugegeben werden und ca. 1 Min. Kräftig geschüttelt wird. Danach tritt die Trennung fast immer ein, jedoch ist dabei die Hormonausbeute nicht mehr vollständig. Solche Proben sollten von vorneherein besser gleich verworfen werden.

#### 4. Fraktionierung in saure, neutrale und phenolische Anteile (siehe auch S. 15).

Die vereinigten Ätherauszüge werden nun zur Entfernung der sauren Bestandteile mit 25 ccm gesättigter Natriumbicarbonatlösung 2 Min. geschüttelt.

Hierbei tritt manchmal starke  $\text{CO}_2$ -Entwicklung unter Schaumbildung auf. Ist diese so stark, daß die Flüssigkeit überzulaufen droht, gibt man sofort 25 ccm 1 n Natronlauge zu, ohne weiter mit Natriumbicarbonatlösung auszuschütteln; hierdurch hat sich nachweislich keine Änderung der Ergebnisse gezeigt. Ist die Schichtentrennung nach einigen Minuten deutlich erfolgt, so wird die hellbraune, undurchsichtige Natriumbicarbonatschicht abgelassen und verworfen. Der Äther wird ein zweitesmal mit 20 ccm gesätt. Natriumbicarbonatlösung 2 Min. ausgeschüttelt, die ebenfalls verworfen wird.

Der nun gelbbraun gefärbte Ätherauszug wird, um die phenolischen Steroide zu beseitigen, mit 25 ccm 1n Natronlauge 2 Min. lang geschüttelt, stehengelassen und die dunkelbraune, undurchsichtige  $\text{NaOH}$ -Phase verworfen. Anschließend schüttelt man den Äther noch zweimal mit je 20 ccm 1n Natronlauge, je 2 Min. lang, und läßt jeweils die Natronlageschichten ab.

Um die restliche Natronlauge vollständig zu entfernen, wird der Ätherauszug so oft mit 30 ccm Aq.dest. gewaschen (ca. drei - bis viermal) bis dieses beim Ablassen vollständig neutral reagiert (Prüfung mit Universal-Indikatorpapier).

Das letzte Waschwasser muß besonders sorgfältig abgelassen werden, so daß keinerlei Wasser mehr im Äther verbleibt, umgekehrt aber auch kein Äther verworfen wird. Zur vollständigen Trocknung wird zum Ätherextrakt eine Prise geglühtes Natriumsulfat gegeben und anschließend filtriert.

5. Entfernung des Extraktionsmittels (siehe auch S. 17).

Den zuletzt dunkelorange gefärbten Äther überführt man nun quantitativ in einen 100 ccm fassenden Schliffkolben und destilliert das Extraktionsmittel bis zur Trockene ab. Es bleibt in dem Kolben der braunrot gefärbte Steroidrückstand, der vollkommen trocken sein muß.

Hier schließt sich nun die eigentliche quantitative Bestimmung der 17-Ketosteroide mit *m*-Dinitrobenzol nach *Zimmermann* an, deren Ausführung auf S. 32 beschrieben ist.

II. Aufarbeitung zur Bestimmung der "gereinigten" 17-Ketosteroide  
(= 17-Ketosteroide mit Anwendung der Girard-Reinigung)

Man geht ebenfalls von einer 50-ccm-Harnprobe aus und führt

1. mit denselben Reagentien in der gleichen Weise
2. die Hydrolyse und
3. die Extraktion sowie
4. die Fraktionierung in saure, neutrale und phenolische Anteile durch. Auch
5. die Entfernung des Extraktionsmittels wird wie bei der Aufarbeitung zur Bestimmung der ungereinigten 17-Ketosteroide ausgeführt. Anschließend folgt:
6. Fraktionierung in ketonische und nichtketonische Anteile mit Hilfe des Girard-Verfahrens. (siehe auch S. 15)

Der nach Entfernung des Extraktionsmittels verbleibende braunrot gefärbte Steroidrückstand wird nun zum Zweck der Entfernung störender Chromogene dem GIRARD-Verfahren nach der Arbeitsvorschrift von *Abelin* (2) unterworfen. Diese Vorschrift ergab im Gegensatz zu der von uns anfangs verwandten, etwas einfacheren Methode nach *Weissbecker* (81) wesentlich exaktere Ergebnisse, so daß wir sämtliche Hauptversuche nach dieser Vorschrift durchführten (siehe S. 45).

Die folgende Beschreibung schildert also die von uns angewandte Methode der GIRARD-Trennung nach *Abelin*.

a) Reagentien

Eisessig

Girard-Reagens T, mit Methanol angeteigt

Natronlauge, 10 %ig

Äther, peroxydfrei

Natriumkarbonatlösung, 2,5 %ig

b) Überführung der ätherlöslichen Ketosteroide in wasserlösliche Hydrazone.

Der gut getrocknete, braunrote Steroidrückstand wird in 1 ccm Eisessig gelöst. Zu der Lösung gibt man eine gute Spatelspitze Girard-Reagens T. Nun löst man unter leichtem Erwärmen so lange, bis eine klare, durchsichtige, dunkelrote Flüssigkeit entsteht, die keine Girard-Kristalle oder sonstige ungelöste Partikel enthält. Dieses vollständige Lösen ist für die quantitative Überführung der Ketosteroide in Hydrazone von großer Bedeutung. Anschließend bringt man das Ganze in ein Ölbad und hält es dort bei 90 - 100 °C genau 20 Min. lang. Während dieser Zeit darf das Girard-Reagens nicht auskristallisieren, sondern die Lösung muß klar und dunkelrot bleiben. Nach dieser Reaktionszeit fügt man der abgekühlten Lösung 15 ccm eiskaltes Wasser bei und neutralisiert die Essigsäure sofort mit 10 %iger Natronlauge. Dann überführt man die Mischung quantitativ in einen 250 ccm fassenden Scheidetrichter und extrahiert 5 Min. mit 20 ccm Äther, der sich dabei orange bis rötlich färbt. Die gelbliche wässrige Phase, die nun die Hydrazone der Ketosteroide enthält, wird nach deutlicher Trennung in einen zweiten Schütteltrichter abgelassen und wieder mit 20 ccm Äther 5 Min. extrahiert, dann in einen dritten Schütteltrichter abgelassen und noch einmal mit 20 ccm Äther 5 Min. ausgeschüttelt.

Nach erfolgter, deutlicher Schichtung läßt man die gelbliche wässrige Phase, die nun die wasserlöslichen Hydrazone der Ketosteroide enthält, in ein Becherglas ab.

Die drei Ätherauszüge, von denen der erste, wie oben gesagt, orange bis rötlich und der letzte farblos ist, werden nun in einen Schütteltrichter quantitativ überführt und zur Entfernung noch eventuell vorhandener wasserlöslicher Hydrazone zuerst mit 10 ccm eiskaltem Wasser, dann zweimal mit je 10 ccm 2,5 %iger Natriumkarbonatlösung und zuletzt dreimal mit je 10 ccm Aq.dest., jeweils 2 Min., gewaschen, wobei die schwere Phase, also Aq.dest. bzw. Natriumkarbonatlösung, jedesmal in das Becherglas mit den

wasserlöslichen Ketosteroid-Hydrazone abgelassen wird. Die Ätherphase, welche die nichtketonischen Anteile enthält, wird verworfen. Auch hier ist streng darauf zu achten, daß niemals Äther in die wässrige Phase abgelassen wird und daß zuletzt kein Wasser mehr beim Äther verbleibt. Eine Trocknung mit geglühtem  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  erwies sich hier als überflüssig (siehe Eichkurve und Diskussion der GIRARD-Trennungsmethode S. 45).

c) Rückführung der wasserlöslichen Hydrazone in ätherlösliche Ketosteroide.

In das Becherglas, das die Hydrzone der Ketosteroide in wässriger Lösung enthält, gibt man 3 ccm konz. Salzsäure und läßt es 2 Std. stehen. Infolge Hydrolyse werden die Hydrazone gespalten, und es bilden sich wieder die ätherlöslichen Ketosteroide. Danach wird die wässrige Phase wiederum dreimal mit je 20 ccm Äther 5 Min. lang extrahiert, wobei nun die Ketosteroide in die Ätherphase übergehen. Die wässrige Phase wird dann verworfen und der Äther zur Entfernung aller wasserlöslichen Bestandteile anschließend noch einmal mit 10 ccm 2,5 %iger Natriumkarbonatlösung und dreimal mit je 10 ccm destilliertem Wasser gewaschen. Wiederum ist große Aufmerksamkeit darauf zu richten, daß kein Äther abgelassen wird und am Ende kein Wasser im Äther zurückbleibt. Zur vollständigen Trocknung wird zum Ätherextrakt eine Spatelspitze geglühtes  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  gegeben und anschließend filtriert.

d) Entfernung des Extraktionsmittels

Den Äther überführt man zuletzt quantitativ in einen 100 ccm fass. Schliffkolben und dampft ihn bis zur Trockene ab. Der farblos bis gelbliche Rückstand stellt das gereinigte sterioide Produkt dar.

Nun schließt sich auch hier, genau wie bei den "ungereinigten" 17-Ketosteroiden die eigentliche quantitative Bestimmung mit Hilfe der m-Dinitrobenzolreaktion nach Z i m m e r m a n n an.

D) Quantitative Bestimmung des Harnextraktes mit Hilfe der m-Dinitrobenzol-  
reaktion nach Z i m m e r m a n n (siehe S. 18).

Reagentien: m-Dinitrobenzollösung, alkoholisch, 2 %ig (wöchentlich aus  
1 gr m-Dinitrobenzol p.A. und 50 ccm absol., unvergälltem  
Alkohol herzustellen);  
absoluter, unvergällter Äthylalkohol; 3n-Kalilauge.

Der trockene Steroidrückstand wird in 5 ccm absolutem, unvergälltem Alkohol  
vollständig gelöst. (Bei einer Ausgangsmenge von 50 ccm Harn entspricht dies  
einem Konzentrationsverhältnis von 1:10). Dieses Lösen muß mit besonderer  
Sorgfalt vorgenommen werden (evtl. unter leichtem, kurzem Erwärmen), da klei-  
ste ungelöste Steroidanteile das Ergebnis bereits erheblich vermindern.

Anschließend muß die Lösung unter fließend kaltem Wasser so lange abgekühlt  
werden, bis gelblichweiße Flocken ausfallen, deren Zusammensetzung unbekannt  
ist. Werden diese jedoch bei diesem Prozeß nicht entfernt, treten sie bei den  
nachfolgenden Reaktionen störend in Erscheinung. Aus diesem Grunde werden sie  
durch ein Filter S&S Nr. 595 abfiltriert.

Von der klaren, dunkelroten (bei "ungereinigten" 17-Ketosteroiden) oder hell-  
rosa (bei "gereinigten" 17-Ketosteroiden) Flüssigkeit wird nun in 2 Reagenz-  
gläser genau je 1 ccm pipettiert. In ein drittes Reagenzglas gibt man als  
Blindwert statt der alkoholischen Hormonlösung 1 ccm absoluten, unvergällten  
Alkohol. Dann pipettiert man zu allen drei Proben je 1 ccm m-Dinitrobenzollö-  
sung und je 1 ccm 3 n KOH. Die Gläser werden geschüttelt, verstöpselt und bei  
25°C genau 55 Min. in einen abgedunkelten Thermostaten gestellt.

Nach dieser Zeit gibt man jeder Probe 6 ccm Äther zu, schüttelt gut und fil-  
triert durch Filter S&S Nr. 595. Nun füllt man eine 1 cm Küvette mit der far-  
losen Blindwert-Flüssigkeit und eine 1 cm-Küvette mit einer der beiden rosa b-  
violettrot gefärbten Proben und photometriert genau nach insgesamt 60 Min. -  
im elektrischen Photometer (Zeiss ELKO II) bei Filter S 50 (Bestimmung des F-  
terschwerpunktes siehe S. 33). Zur Kontrolle mißt man noch die zweite Hormon-  
probe gegen den Blindwert. Der erhaltene Extinktionswert kann mit Hilfe der  
Eichkurve (Aufstellung der Eichkurve siehe S. 33) in mg 17-Ketosteroide/ltr.  
Harn ausgedrückt und durch Multiplikation mit der 24-Std.-Harnmenge in mg  
17-Ketosteroide/24 Std. (= Tg) umgerechnet werden. Die Reaktionszeit von ins-  
gesamt 60 Min. muß genauestens eingehalten werden, da sich die Werte bereits  
nach wenigen Minuten infolge der Lichtempfindlichkeit des Farbkomplexes ver-  
ändern können.

#### E) Bestimmung des Filterschwerpunktes.

Bei der Bestimmung des Filterschwerpunktes ermittelt man denjenigen Filter, bei dem die Lichtdurchlässigkeit der zu untersuchenden Proben am geringsten bzw. die Absorption am größten ist. Für jede Farbqualität muß der Filterschwerpunkt bestimmt werden. Da sich der rotviolette Farbkomplex bei der m-Dinitrobenzolreaktion nach Z i m m e r m a n n bei den einzelnen Hormonproben lediglich in seiner Intensität ändert, können mit dem einmalig ermittelten Filter sämtliche Proben photometriert werden.

Man geht so vor: Eine Hormonprobe wird bei sämtlichen Filtern der Reihe nach photometriert; der Filter, welcher die höchste Extinktion ergibt - in unserem Falle Filter S.49 oder S. 50 - (entsprechend einem Durchlässigkeitsmaximum bei 4960 Å) wird bei den weiteren Untersuchungen verwendet.

#### F) Aufstellung der Eichkurve

Die Eichkurve dient zur Umrechnung der bei der colorimetrischen Messung erhaltenen Extinktionswerte in mg 17-Ketosteroide.

Als Eichsubstanz wurde reines kristallines Androsteron verwendet. 10,0 mg Androsteron wurden in 10 ccm absol., unvergällt. Alkohol gelöst, und damit Konzentrationen von

|                     |   |
|---------------------|---|
| 0,04 mg Androsteron |   |
| 0,10 mg             | " |
| 0,20 mg             | " |

pro 1 ccm Alkohol

hergestellt.

Zur Aufstellung der Eichkurve der "ungereinigten" 17-Ketosteroide wurde von jeder Konzentration 1 ccm (entsprechend einer Ausgangsmenge von 10 ccm Harn) zur Reaktion angesetzt. Die ermittelten Extinktionen von 0,110 0,275 0,550 entsprachen einer Konzentration von 0,04 0,10 0,20 Androsteron.

Diese Hormonkonzentrationen müssen entsprechend der angewandten Methodik von 10 ccm Harnaussgangsmenge auf 1 ltr. Harn bezogen werden.

So ergab sich also bei einer Extinktion von

|       |       |                           |
|-------|-------|---------------------------|
| 0,110 | 4 mg  | Androsteron / 1 ltr. Harn |
| 0,275 | 10 mg | "                         |
| 0,550 | 20 mg | "                         |

Diese Werte ergeben graphisch dargestellt eine Gerade, die durch den 0-Punkt läuft.

Die Eichkurve für die "gereinigten" 17-Ketosteroide muß theoretisch dieselbe sein wie die der "ungereinigten", da die Ausgangskonzentrationen des Androsteron als Ketosteroid auch nach der Reinigung vorliegen und durch die m-Dinitrobenzolreaktion bestimmt werden. Verluste könnten höchstens durch den Arbeitsgang zustande kommen.

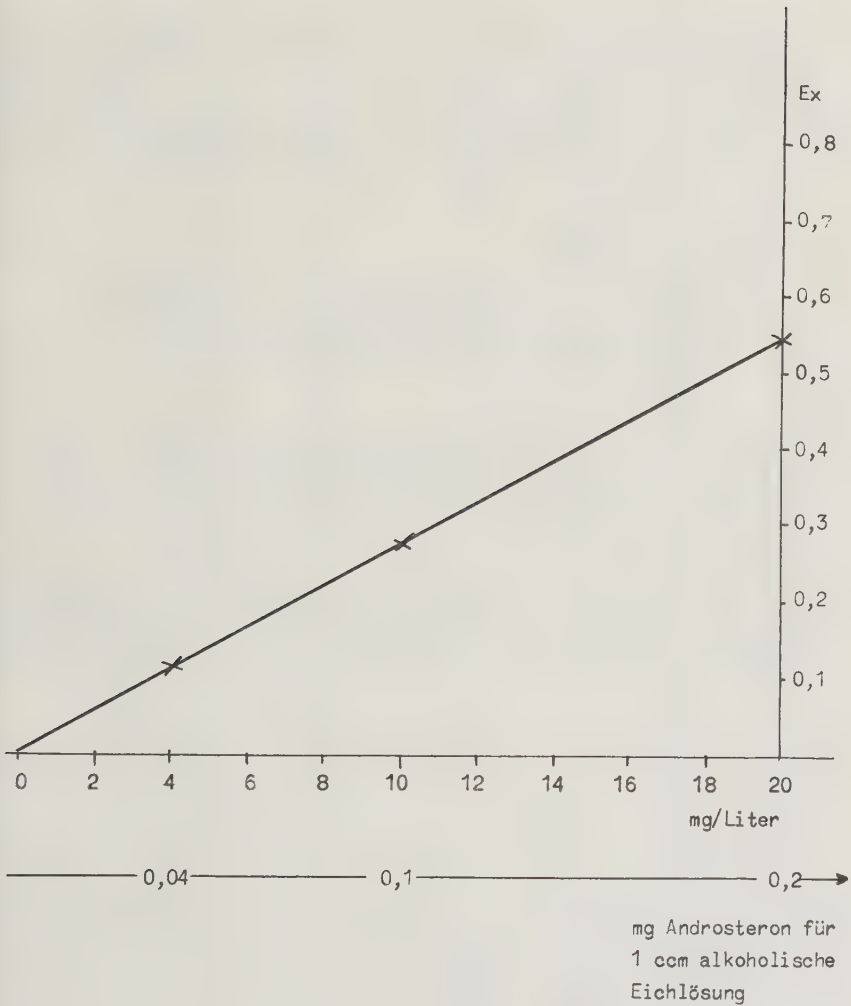
Wir gingen dabei von denselben Androsteronkonzentrationen aus. Der Alkohol der Eichlösung wurde über dem Wasserbad abgedampft, so daß das kristalline Androsteron als Rückstand blieb. Dieses wurde mit Eisessig und Girard-Reagens T versetzt und das Girard-Verfahren in der üblichen Weise durchgeführt. Der nach Abdestillieren des Äthers verbleibende Androsteronrückstand wurde in 3 ccm absol., unvergällt. Alkohol gelöst und 1 ccm davon, in dem sich also nur ein Drittel der Ausgangskonzentration befand, zur Z i m m e r - m a n n - Reaktion angesetzt. Die erhaltenen Werte entsprachen also nur dem dritten Teil der ursprünglichen Androsteronkonzentration und mußten deshalb umgerechnet werden. So ergab sich

als abgeles. Extinkt. 0,037 u. umgerechnet 0,111 entspr. 4 mg Andr./1 ltr. Harn  
0,090 0,270 10 mg "  
0,180 0,540 20 mg

Tabelle 1: Werte der Eichkurve

| Ausgangs-<br>konzentr.<br>mg Andr. | <u>"ungereinigte" 17-Ketosteroide</u> |                         | <u>"gereinigte" 17-Ketosteroide</u> |               |                        |
|------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|---------------|------------------------|
|                                    | abgeles. Ex.                          | mg Andr./1 Ltr.<br>Harn | abgeles. Ex.                        | umgerech. Ex. | mg Andr./<br>1 ltr. H. |
| 0,04                               | 0,110                                 | 4                       | 0,037                               | 0,111         | 4                      |
| 0,10                               | 0,275                                 | 10                      | 0,090                               | 0,270         | 10                     |
| 0,20                               | 0,550                                 | 20                      | 0,180                               | 0,540         | 20                     |

Abbildung: Eichkurve zur Bestimmung der 17-Ketosteroide  
bei Filter S 49;  $d = 1 \text{ cm}$



## V. E R G E B N I S S E

In Tabelle 2 ist eine Zusammenstellung sämtlicher 17-Ketosteroidwerte (mg/Liter- und mg/Tg-Werte) der einzelnen Tiere, deren Harn analysiert wurde, angegeben. Einige wenige Werte waren eindeutig von der Norm abweichend; sie wurden mit angeführt und in der Tabelle mit +) gekennzeichnet, jedoch zur Berechnung der Durchschnittswerte nicht mit herangezogen.

Die Tabelle 3 zeigt unter

- a) die Mittelwerte der einzelnen Tiere und die Abweichungen,
- b) die Mittelwerte sämtlicher Bullen, Kühe und Kälber und deren Abweichungen von den durchschnittlichen Werten der Einzeltiere.

Um eine Beziehung zwischen den ungereinigten und gereinigten 17-Ketosteroidwerten herzustellen, sind in der Tabelle 4 am Beispiel der Kuh II Quotienten aufgeführt, die sich aus der Division ungereinigte 17-Ketosteroide (mg/Tg): gereinigte 17-Ketosteroide (mg/Tg) ergeben.

Aus versuchstechnischen Gründen mußte gelegentlich auf einige Bestimmungen verzichtet werden. Diese sind in den Tabellen jeweils entsprechend gekennzeichnet.

Tabelle 2: 17-Ketosteroidwerte der untersuchten Tiere.

| Tier               | Datum | Menge<br>in ltr. | spez.Gew.<br>s | unger.17-Ketost. |       | gereinigte 17-Ketost. |       |
|--------------------|-------|------------------|----------------|------------------|-------|-----------------------|-------|
|                    |       |                  |                | mg/ltr.          | mg/Tg | mg/ltr.               | mg/Tg |
| Bulle A            | 29.7. | 9,0              | 1,020          | 11,4             | 102,6 | 4,9                   | 44,1  |
|                    | 30.7. | 12,6             | 1,020          | 13,7             | 172,6 | 5,0                   | 63,0  |
|                    | 1.8.  | 18,8             | 1,016          | 10,6             | 199,3 | 3,8                   | 71,4  |
|                    | 3.8.  | 19,5             | 1,016          | 11,6             | 226,2 | 4,3                   | 83,9  |
|                    | 4.8.  | 18,4             | 1,014          | 9,6              | 176,6 | 3,6                   | 66,2  |
|                    | 5.8.  | 17,6             | 1,014          | 12,9             | 227,0 | 4,9                   | 86,2  |
|                    | 6.8.  | 23,4             | 1,016          | 12,4             | 286,2 | 3,4                   | 79,6  |
|                    | 8.8.  | 7,7              | 1,020          | -                | -     | 4,6                   | 35,4  |
|                    | 9.8.  | 12,9             | 1,018          | 13,3             | 171,6 | 4,5                   | 61,3  |
|                    | 10.8. | 23,5             | 1,014          | -                | -     | 3,3                   | 78,7  |
|                    | 11.8. | 22,6             | 1,020          | 12,0             | 271,2 | 3,5                   | 79,1  |
|                    | 12.8. | 13,7             | 1,022          | 13,8             | 189,1 | 4,5                   | 61,7  |
|                    | 13.8. | 7,9              | 1,026          | -                | -     | 5,3                   | 41,5  |
|                    | 17.8. | 10,2             | 1,024          | 15,5             | 158,1 | 5,5                   | 56,1  |
| Bulle B<br>1.Vers. | 20.8. | 3,8              | 1,040          | -                | -     | 12,9                  | 48,4  |
|                    | 23.8. | 5,2              | 1,034          | -                | -     | 10,1                  | 52,4  |
|                    | 24.8. | 8,0              | 1,026          | -                | -     | 10,3                  | 82,4  |
|                    | 25.8. | 7,4              | 1,030          | -                | -     | 11,5                  | 85,5  |
|                    | 26.8. | 7,5              | 1,032          | -                | -     | 9,8                   | 73,5  |
|                    | 30.8. | 5,0              | 1,044          | -                | -     | 11,8                  | 59,3  |
|                    | 31.8. | 5,5              | 1,044          | -                | -     | 15,7                  | 86,4  |
|                    | 1.9.  | 8,2              | 1,024          | -                | -     | 8,7                   | 71,0  |
|                    | 2.9.  | 3,6              | 1,032          | -                | -     | 9,9                   | 35,8  |
| Bulle B<br>2.Vers. | 28.9. | 5,0              | 1,040          | -                | -     | 13,4                  | 67,0  |
|                    | 29.9. | 5,3              | 1,040          | 27,7             | 146,8 | 12,3                  | 65,2  |
|                    | 30.9. | 5,2              | 1,040          | 41,2             | 214,2 | 10,9                  | 56,7  |
|                    | 1.10. | 6,1              | 1,038          | 33,4             | 203,7 | 12,0                  | 73,2  |
|                    | 3.10. | 7,0              | 1,040          | 36,2             | 253,2 | 11,8                  | 82,6  |
|                    | 4.10. | 6,5              | 1,040          | 37,8             | 245,7 | 11,2                  | 72,8  |

Fortsetzung Tabelle 2

| Tier                      | Datum  | Menge<br>in ltr. | spez.Gew.<br>s | unger.17-Ketost. |        | gereinigte 17-Ketost. |         |
|---------------------------|--------|------------------|----------------|------------------|--------|-----------------------|---------|
|                           |        |                  |                | mg/ltr.          | mg/Tg  | mg/ltr.               | mg/Tg.  |
| <u>Bulle C</u>            | 9.9.   | 16,3             | 1,016          | -                | -      | 4,3                   | 69,3    |
|                           | 10.9.  | 12,7             | 1,016          | -                | -      | 5,4                   | 67,9    |
|                           | 12.9.  | 6,5              | 1,020          | -                | -      | 7,5                   | 48,4    |
|                           | 13.9.  | 24,2             | 1,010          | -                | -      | 4,5                   | 94,4    |
|                           | 14.9.  | 14,5             | 1,014          | -                | -      | 4,2                   | 60,9    |
|                           | 15.9.  | 20,3             | 1,014          | -                | -      | 4,5                   | 91,4    |
|                           | 16.9.  | 21,4             | 1,006          | -                | -      | 3,6                   | 77,0    |
|                           | 17.9.  | 11,4             | 1,026          | -                | -      | 5,6                   | 64,0    |
|                           | 19.9.  | 7,9              | 1,036          | 22,8             | 180,1  | 13,3                  | 105,5   |
|                           | 20.9.  | 17,4             | 1,016          | -                | -      | 4,6                   | 80,0    |
|                           | 21.9.  | 8,3              | 1,018          | 20,2             | 167,7  | 5,6                   | 46,5    |
|                           | 22.9.  | 24,4             | 1,012          | 11,5             | 280,6  | 3,9                   | 95,2    |
|                           | 23.9.  | 14,0             | 1,020          | 13,7             | 191,8  | -                     | -       |
|                           | 24.9.  | 10,1             | 1,020          | 15,7             | 158,6  | 6,7                   | 67,7    |
| <u>Bulle D</u><br>1.Vers. | 5.10.  | 7,4              | 1,040          | 29,4             | 217,6  | 9,4                   | 69,6    |
|                           | 6.10.  | 7,9              | 1,040          | 30,4             | 240,2  | 9,4                   | 74,3    |
|                           | 7.10.  | 7,1              | 1,040          | 26,6             | 188,9  | 9,1                   | 64,6    |
|                           | 11.10. | 1,7+)            | 1,042          | 30,4             | 51,7+) | 10,1                  | 17,2 +) |
|                           | 12.10. | 7,4              | 1,042          | 30,6             | 226,4  | 9,1                   | 67,3    |
| <u>Bulle D</u><br>2.Vers. | 24.10. | 5,7              | 1,032          | -                | -      | 5,3                   | 30,2    |
|                           | 25.10. | 12,6             | 1,018          | -                | -      | 4,4                   | 55,4    |
|                           | 26.10. | 10,8             | 1,010          | 7,6              | 82,1   | 1,9                   | 20,5    |
|                           | 27.10. | 10,0             | 1,012          | 10,3             | 103,0  | 3,6                   | 36,0    |
|                           | 28.10. | 16,0             | 1,012          | 12,0             | 192,0  | 3,5                   | 56,0    |
|                           | 29.10. | 13,5             | 1,016          | 13,7             | 184,9  | 4,6                   | 62,1    |
|                           | 5.11.  | 5,4              | 1,040          | -                | -      | 8,8                   | 47,5    |
| <u>Bulle E</u>            | 15.11. | 8,0              | 1,044          | 32,2             | 265,6  | 10,5                  | 84,0    |
|                           | 16.11. | 7,2              | 1,050          | 29,6             | 213,1  | 8,6                   | 61,9    |
|                           | 17.11. | 8,0              | 1,043          | 30,4             | 243,2  | 13,8                  | 110,4   |
|                           | 18.11. | 11,2             | 1,039          | 33,2             | 371,8  | 11,0                  | 123,2   |
|                           | 19.11. | 16,0             | 1,038          | 28,8             | 460,8  | 8,8                   | 140,8   |
|                           | 20.11. | 13,6             | 1,039          | 30,0             | 405,0  | 8,8                   | 118,8   |

Fortsetzung Tabelle 2

| Tier          | Datum | Menge<br>in ltr. | unger.17-Ketost. |          | gereinigte 17-Ketost. |          |
|---------------|-------|------------------|------------------|----------|-----------------------|----------|
|               |       |                  | mg/ltr.          | mg/Tg.   | mg/ltr.               | mg/Tg.   |
| <u>Kuh I</u>  | 25.5. | 10,0             | 16,9             | 169,0    | 6,7                   | 67,0     |
| 1.Vers.       | 26.5. | 10,0             | 15,6             | 156,0    | 6,2                   | 62,0     |
|               | 27.5. | 15,0             | 25,6             | 385,0 +) | 10,9 +)               | 164,0 +) |
|               | 30.5. | 13,5             | 19,0             | 256,0    | -                     | -        |
|               | 31.5. | 17,7             | 17,3             | 306,0    | 6,0                   | 106,2    |
|               | 1.6.  | 10,3             | 18,2             | 187,5    | 6,4                   | 65,9     |
|               | 2.6.  | 10,1             | 19,6             | 197,9    | 6,1                   | 61,6     |
| <u>Kuh I</u>  | 14.2. | 10,6             | 16,5             | 174,9    | -                     | -        |
| 2.Vers.       | 15.2. | 25,0             | 14,7             | 367,5    | -                     | -        |
|               | 16.2. | 19,0             | 16,5             | 314,0    | -                     | -        |
|               | 17.2. | 20,5             | 18,3             | 376,9    | -                     | -        |
|               | 18.2. | 22,0             | 17,9             | 393,8    | -                     | -        |
|               | 19.2  | 19,0             | 18,3             | 347,7    | -                     | -        |
|               | 21.2. | 19,0             | 19,8             | 361,0    | -                     | -        |
|               | 24.2. | 20,0             | 17,6             | 352,0    | -                     | -        |
|               | 25.2. | 18,0             | 16,9             | 304,2    | -                     | -        |
|               | 28.2. | 14,0             | 15,0             | 210,0    | -                     | -        |
|               | 1.3.  | 14,0             | 15,8             | 221,2    | -                     | -        |
|               | 2.3.  | 13,5             | 16,5             | 222,7    | -                     | -        |
|               | 3.3.  | 15,6             | 15,6             | 243,4    | -                     | -        |
|               | 4.3.  | 14,2             | 15,8             | 223,6    | -                     | -        |
| <u>Kuh II</u> | 14.6. | 14,0             | 12,4             | 179,8    | 5,5                   | 79,8     |
|               | 15.6. | 11,0             | 13,1             | 150,7    | 4,6                   | 52,9     |
|               | 16.6. | 12,0             | 15,4             | 184,8    | 6,0                   | 72,0     |
|               | 21.6. | 9,5              | 25,6 +)          | 243,2 +) | 10,1 +)               | 96,0 +)  |
|               | 22.6. | 8,0              | 20,4             | 163,2    | 7,7                   | 61,6     |
|               | 23.6. | 12,0             | 16,4             | 196,8    | 6,5                   | 78,5     |
|               | 24.6. | 4,3              | 20,7             | 88,0     | 9,2                   | 39,1     |
|               | 27.6. | 12,5             | 14,5             | 181,3    | 5,8                   | 72,5     |
|               | 28.6. | 7,3              | 20,0             | 145,0    | 8,4                   | 60,9     |
|               | 29.6. | 12,0             | 16,0             | 192,0    | 6,0                   | 72,0     |
|               | 30.6. | 12,0             | 17,4             | 208,8    | 7,0                   | 84,0     |
|               | 1.7.  | 12,5             | 16,0             | 200,0    | 6,2                   | 77,5     |
|               | 4.7.  | 9,0              | 17,8             | 160,2    | 6,6                   | 59,4     |

| Tier           | Datum | Menge   | unger.17-Ketost. |        | gereinigte 17-Ketost. |        |
|----------------|-------|---------|------------------|--------|-----------------------|--------|
|                |       | in ltr. | mg/ltr.          | mg/Tg. | mg/ltr.               | mg/Tg. |
| <u>Kuh III</u> | 6.3.  | 16,6    | 18,6             | 308,8  | -                     | -      |
|                | 7.3.  | 17,1    | 13,6             | 232,6  | -                     | -      |
|                | 8.3.  | 15,5    | 16,2             | 251,1  | -                     | -      |
|                | 9.3.  | 17,6    | 14,3             | 250,7  | -                     | -      |
|                | 10.3. | 16,2    | 18,6             | 301,3  | -                     | -      |
|                | 11.3. | 15,1    | 19,4             | 292,2  | -                     | -      |
|                | 12.3. | 15,1    | 16,1             | 247,9  | -                     | -      |
|                | 14.3. | 15,5    | 17,4             | 269,7  | -                     | -      |
|                | 15.3. | 10,5    | 18,6             | 195,3  | -                     | -      |
|                | 16.3. | 13,5    | 15,7             | 211,9  | -                     | -      |
|                | 17.3. | 11,0    | 16,8             | 184,8  | -                     | -      |
| <u>Kuh IV</u>  | 1.3.  | 12,5    | 15,6             | 191,0  | -                     | -      |
|                | 2.3.  | 12,0    | 17,0             | 211,2  | -                     | -      |
|                | 3.3.  | 20,2    | 15,2             | 307,0  | -                     | -      |
|                | 4.3.  | 23,6    | 15,7             | 370,5  | -                     | -      |
|                | 6.3.  | 20,7    | 12,1             | 249,9  | -                     | -      |
|                | 7.3.  | 19,2    | 13,5             | 259,2  | -                     | -      |
|                | 8.3.  | 18,6    | 15,8             | 293,9  | -                     | -      |
|                | 9.3.  | 19,7    | 17,9             | 352,6  | -                     | -      |
|                | 10.3. | 22,5    | 16,6             | 373,5  | -                     | -      |
|                | 11.3. | 19,5    | 14,0             | 273,0  | -                     | -      |
|                | 14.3. | 17,1    | 15,4             | 263,3  | -                     | -      |

Fortsetzung Tabelle 2

| Tier          | Datum  | Menge<br>in ltr. | spez.Gew.<br>s. | unger.17-Ketost. |        | gereinigte 17-Keto-<br>ster. |        |
|---------------|--------|------------------|-----------------|------------------|--------|------------------------------|--------|
|               |        |                  |                 | mg/ltr.          | mg/Tg. | mg/ltr.                      | mg/Tg. |
| <u>Kalb a</u> | 26. 9. | 6,8              | 1,006           | 0,9              | 6,1    | -                            | -      |
|               | 27. 9. | 4,8              | 1,006           | 1,0              | 4,8    | -                            | -      |
|               | 28. 9. | 5,3              | 1,010           | 1,0              | 5,3    | -                            | -      |
|               | 29. 9. | 3,8              | 1,008           | 1,6              | 6,1    | -                            | -      |
|               | 30. 9. | 4,5              | 1,008           | 2,0              | 9,0    | -                            | -      |
|               | 1.10.  | 7,4              | 1,004           | 1,4              | 10,4   | -                            | -      |
| <u>Kalb b</u> | 3.10.  | 6,7              | 1,008           | 1,2              | 8,0    | -                            | -      |
|               | 4.10.  | 5,0              | 1,006           | 1,4              | 7,0    | -                            | -      |
|               | 5.10.  | 4,5              | 1,010           | 1,3              | 5,9    | -                            | -      |
| <u>Kalb c</u> | 15.10. | 9,5              | 1,004           | 1,6              | 15,2   | 0,4                          | 3,8    |
|               | 16.10. | 5,7              | 1,006           | 2,4              | 13,7   | 0,4                          | 2,3    |
|               | 17.10. | 4,4              | 1,012           | 2,3              | 10,1   | 0,7                          | 3,1    |
|               | 18.10. | 4,8              | 1,010           | 1,9              | 9,1    | 0,6                          | 2,9    |
| <u>Kalb d</u> | 12.10. | 4,6              | 1,008           | 1,8              | 8,3    | 0,9                          | 4,1    |
|               | 13.10. | 4,3              | 1,006           | 1,9              | 8,2    | 0,9                          | 3,9    |
|               | 14.10. | 5,5              | 1,004           | 1,1              | 6,1    | 0,5                          | 2,8    |
| <u>Kalb e</u> | 10.10. | 7,0              | 1,008           | 2,7              | 18,9   | 0,8                          | 5,6    |
|               | 11.10. | 5,3              | 1,006           | 3,6              | 19,1   | 1,0                          | 5,3    |

Tabelle 3: Mittelwerte und Abweichungen

- a) Mittelwerte der einzelnen Tiere und Abweichungen  
b) Mittelwerte sämtlicher Bullen, Kühe und Kälber nach  
Alter und deren Abweichungen von den durchschnitt-  
lichen Werten der Einzeltiere.

| Tier              | ungereinigte 17-Ketosteroide |              | gereinigte 17-Ketosteroide |              |
|-------------------|------------------------------|--------------|----------------------------|--------------|
|                   | mg/ltr.                      | mg/Tg.       | mg/ltr.                    | mg/Tg.       |
| <u>a)</u>         |                              |              |                            |              |
| Bulle A           | 12,4 ± 0,5                   | 198,2 ± 15,8 | 4,4 ± 0,2                  | 64,9 ± 4,3   |
| Bulle B 1.Versuch | -                            | -            | 11,2 ± 0,7                 | 66,1 ± 6,0   |
| Bulle B 2.Versuch | 35,3 ± 2,3                   | 212,7 ± 19,0 | 11,9 ± 0,4                 | 69,6 ± 3,6   |
| Bulle C           | 16,8 ± 2,1                   | 197,8 ± 22,0 | 5,7 ± 0,7                  | 74,5 ± 5,1   |
| Bulle D 1.Versuch | 29,5 ± 0,8                   | 213,2 ± 11,2 | 9,4 ± 0,2                  | 68,9 ± 2,1   |
| Bulle D 2.Versuch | 10,9 ± 1,3                   | 140,5 ± 28,2 | 4,6 ± 0,8                  | 43,9 ± 5,9   |
| Bulle E           | 30,9 ± 0,8                   | 326,6 ± 40,7 | 10,3 ± 0,8                 | 106,5 ± 11,8 |
|                   |                              |              |                            |              |
| Kuh I 1.Versuch   | 17,8 ± 0,6                   | 212,1 ± 21,0 | 6,3 ± 0,1                  | 72,5 ± 4,6   |
| Kuh I 2.Versuch   | 16,8 ± 0,4                   | 293,8 ± 18,0 | -                          | -            |
| Kuh II            | 16,7 ± 0,8                   | 170,9 ± 9,5  | 6,6 ± 0,4                  | 67,5 ± 3,8   |
| Kuh III           | 16,9 ± 0,6                   | 248,8 ± 12,6 | -                          | -            |
| Kuh IV            | 15,4 ± 0,5                   | 285,9 ± 18,4 | -                          | -            |
|                   |                              |              |                            |              |
| Kalb a            | 1,3 ± 0,2                    | 6,9 ± 0,9    | -                          | -            |
| Kalb b            | 1,3 ± 0,05                   | 7,0 ± 0,6    | -                          | -            |
| Kalb c            | 2,1 ± 0,2                    | 12,0 ± 1,4   | 0,5 ± 0,1                  | 3,0 ± 0,3    |
| Kalb d            | 1,6 ± 0,2                    | 7,6 ± 0,7    | 0,7 ± 0,1                  | 3,6 ± 0,4    |
| Kalb e            | 3,2 ± 0,5                    | 19,0 ± 0,9   | 4,0 ± 1,0                  | 5,5 ± 0,2    |
| <u>b)</u>         |                              |              |                            |              |
| Bullen            | 22,6 ± 4,3                   | 214,8 ± 25,0 | 8,2 ± 1,5                  | 70,6 ± 7,0   |
| Kühe              | 16,7 ± 0,5                   | 242,3 ± 23,1 | 6,5 ± 0,2                  | 70,0 ± 3,5   |
| Kälber            |                              |              |                            |              |
| (3-4 Wochen)      | 1,3 ± 0                      | 7,0 ± 0,03   | -                          | -            |
| ( 5 Wochen)       | 1,9 ± 0,2                    | 10,1 ± 5,0   | 0,6 ± 0,1                  | 3,3 ± 0,3    |
| ( 7 Wochen)       | 3,2 ± 0                      | 19,0 ± 0     | 0,9 ± 0                    | 5,5 ± 0      |

Tabelle 4:

Quotienten  $\frac{\text{ungereinigte 17-Ketosteroide (mg/Tg)}}{\text{gereinigte 17-Ketosteroide (mg/Tg)}}$

am Beispiel der Kuh II.

| Datum | ungereinigte<br>17-Ketosteroide<br>mg/Tg | gereinigte<br>17-Ketosteroide<br>mg/Tg | $\frac{\text{ungereinigte 17-Ketost. (mg/Tg)}}{\text{gereinigte 17-Ketost. (mg/Tg)}}$ |
|-------|------------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 14.6. | 179,8                                    | 79,8                                   | 2,25                                                                                  |
| 15.6. | 150,7                                    | 52,9                                   | 2,85                                                                                  |
| 16.6. | 184,8                                    | 72,0                                   | 2,17                                                                                  |
| 22.6. | 163,2                                    | 61,6                                   | 2,66                                                                                  |
| 23.6. | 196,8                                    | 78,5                                   | 2,35                                                                                  |
| 24.6. | 88,0                                     | 39,1                                   | 2,25                                                                                  |
| 27.6. | 181,3                                    | 72,5                                   | 2,50                                                                                  |
| 28.6. | 145,0                                    | 60,9                                   | 2,40                                                                                  |
| 29.6. | 192,0                                    | 72,0                                   | 2,65                                                                                  |
| 30.6. | 208,8                                    | 84,0                                   | 2,49                                                                                  |
| 1.7.  | 200,0                                    | 77,5                                   | 2,58                                                                                  |
| 4.7.  | 160,2                                    | 59,4                                   | 2,70                                                                                  |

Durchschnitt:  $2,49 \pm 0,06$

## VI: BESPRECHUNG VON METHODIK UND ERGEBNISSEN

### 1.) Zur Methodik

#### a) Beziehungen zwischen der Harnmenge und dem spez. Gewicht

Die 24-Std.-Harnportion ist in Bezug auf ihre Menge sehr starken Schwankungen unterworfen, welche zum großen Teil von der Art der Fütterung (Wassergehalt des Futters) und den Temperaturbedingungen sowie der Luftfeuchtigkeit abhängig sind. So liegt z.B. bei Rauhfuttermittelverabreichung die 24-Std.-Harnmenge wesentlich (oft über die Hälfte) niedriger als bei ausschließlichen Grünfüttergaben; die Kälber, die nur flüssige Nahrung erhielten, schieden Harnmengen aus, die manchmal ebenso hoch lagen, wie die der Bullen oder Kühe. Hierbei ist jedoch zu beobachten, daß das spez. Gewicht des Harnes deutliche Unterschiede zeigt, und zwar größtenteils so, daß das Verhältnis Harnmenge:spez.Gewicht sich umgekehrt proportional verhält.

Infolgedessen ist es notwendig, die Gesamttagesmenge des Harns zu erfassen und zur Kontrolle die Größe des spez. Gewichtes zu bestimmen, vor allen Dingen für diejenigen Fälle, in denen unterschiedliche Tagesharnmengen ausgeschieden werden. Dies war bei den hier untersuchten Kühen nicht der Fall, dagegen aber bei den Bullen und den ebenso zu den Untersuchungen herangezogenen Kälbern.

Auf diese Weise können die infolge der wechselnden Tagesharnmengen unterschiedlichen Hormonausscheidungen annähernd ausgeglichen werden, so daß die Hormonexkretion bei normalen, unbelasteten Tieren weitgehend konstant ist.

#### b) Zur Konservierung des Harnes

Um sich Erleichterungen für die Aufarbeitung der Harnproben zu verschaffen, wurde versucht, den Harn wenigstens für einige Tage aufbewahren zu können. Es wurde versucht, eine Konservierung zu erreichen durch Zusatz von Phenol zum Harn bei Aufbewahrung im Kühlschrank, durch Tiefkühlung des Harns mittels Kohlensäureschnees oder durch Aufbewahrung des eingedampften Steroidrückstandes im Kühlschrank. Dabei ergaben sich aber bei allen versuchten Möglichkeiten höhere Werte als bei den nicht konservierten, sogleich untersuchten Kontrollproben:

Zusatz von 2 gr. Phenol zu 500 ccm Harn und Aufbewahrung bei Kühlschranktemperatur (ca. + 5 °C)

|                                                               |     |         |
|---------------------------------------------------------------|-----|---------|
| 1) Kontrollprobe                                              | 4,5 | mg/ltr. |
| 2) Untersuchung sofort nach Abkühlung auf Kühlschranktemp.    | 4,3 | "       |
| 3) Untersuchung nach 24-stündiger Aufbewahrung im Kühlschrank | 5,9 | "       |

Einfrieren mit Kohlensäureschnee

|                                              |     |   |
|----------------------------------------------|-----|---|
| 1) Kontrollprobe                             | 4,6 | " |
| 2) Untersuchung sofort nach Einfrieren       | 3,1 | " |
| 3) Untersuchung nach 24-stündigem Einfrieren | 5,3 | " |

Aufbewahrung des Steroidrückstandes bei Kühlschranktemperatur

|                                                                 |     |   |
|-----------------------------------------------------------------|-----|---|
| 1) Kontrollprobe                                                | 6,0 | " |
| 2) Untersuchung sofort nach Abkühlung auf Kühlschranktemperatur | 5,8 | " |
| 3) Untersuchung nach 24-stündiger Aufbewahrung im Kühlschrank   | 9,0 | " |

Nach diesen Ergebnissen kann eine befriedigende Konservierung mit den angewandten Methoden nicht empfohlen werden.

c) Zur GIRARD - Trennungsmethode

Um aus der neutralen Steroidfraktion die Ketosteroido quantitativ zu erfassen, wurde zunächst die GIRARD-Trennung nach der Arbeitsvorschrift von Weissbäcker (81) durchgeführt. Sie erfordert wohl einen wesentlich geringeren Zeit- und Materialaufwand als die später von uns benutzte Methode nach A belin (2), jedoch ließen sich damit keine befriedigenden Ergebnisse erzielen. Die Werte, die mit Eichlösung aufgestellt wurden, lagen durchweg zu niedrig, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß die Waschungen mit Wasser und 2,5 %iger Natriumkarbonatlösung, wie sie bei A belin vorgeschrieben sind (siehe S. 29) wegfallen, wodurch die Überführung der 17-Ketosteroido in Hydrazone und umgekehrt nicht hinreichend quantitativ erfolgt. Deshalb arbeiteten wir nach der zwar etwas um-

ständlicheren Methode nach A b e l i n , die jedoch tadellose Ergebnisse lieferte.

Weiter muß bemerkt werden, daß das GIRARD-Reagens T nur dann längere Zeit haltbar ist, wenn es mit Methanol angeteigt wird, Kristallines GIRARD-Reagens ist stark hygroskopisch und liefert unspezifische Werte.

Am Beginn der Routineuntersuchungen mit der GIRARD-Trennung nach der Arbeitsvorschrift von A b e l i n stellten wir einige Vorversuche an.

Wir prüften zunächst mit Eichlösung, ob bei der Überführung der Ketosteroide in wasserlösliche Hydrazone in den zu verwerfenden Ätherauszügen evtl. noch Hormone zurückbleiben und mit verworfen werden. Wir brachten deshalb die üblicherweise zu verwerfenden Ätherauszüge, die da es sich um Eichlösung handelte, vollkommen farblos waren, in einen 250 ccm-fassenden Schliffkolben und dampften bis zur Trockene ab. Den kaum sichtbaren Rückstand lösten wir in 3 ccm Alkohol und setzten 1 ccm davon mit m-Dinitrobenzollösung und Kalilauge zur Reaktion an. Es ergab sich eine Extinktion von 0,005, die praktisch gleich 0 gesetzt werden kann. Das verwandte 17-Ketosteroid (in diesem Falle reines Androsteron) ist also vollständig in Hydrazone übergeführt worden. Dann untersuchten wir, ob mit Wasser oder Natriumkarbonatlösung Ketosteroide (am Modell des Androsteron) ausgewaschen werden. Dabei gingen wir so vor: Die Eichsubstanz wurde in Eisessig gelöst und ohne GIRARD-Reagens 20 Min. in ein Ölbad von 90 - 100°C gebracht; es erfolgte also während dieser Zeit keine Umwandlung des verwendeten Androsterons in ein Hydrazon. Nun wurde, wie üblich, mit Äther, Wasser und Natriumkarbonatlösung ausgeschüttelt (wobei sich in der Ätherphase die gesamten 17-Ketosteroide befinden müssen), die wässrige Phase 2 Std. der Hydrolyse unterzogen und anschließend wieder mit Äther extrahiert und der Äther mit Wasser und Natriumkarbonatlösung gewaschen. In dieser Ätherphase dürfen sich keine Hormone befinden, da sie anfangs gar nicht in die wässrige Phase übergegangen sein dürfen. Der Äther wurde abdestilliert, der kaum sichtbare Rückstand in 3 ccm absol. unvergällt. Alkohol aufgenommen und 1 ccm davon zur Z i m m e r m a n n - Reaktion angesetzt. Die abgelesene Extinktion betrug - 0,03, praktisch gleich 0.

Es wird also kein Androsteron mit Wasser oder Sodalösung ausgewaschen. Daraus darf gefolgert werden, daß auch die anderen 17-Ketosteroide bei diesen Waschungen mit Aqua dest. und Natriumkarbonatlösung nicht verloren gehen.

## 2.) Zu den Ergebnissen

Die 17-Ketosteroid-Ausscheidung im Harn wurde bei 5 Bullen, 4 Kühen und 5 Kälbern durch die *m*-Dinitrobenzolreaktion nach *Zimmermann* bestimmt, und zwar vergleichend mit (gereinigte 17-Ketosteroide) und ohne (ungereinigte 17-Ketosteroide) vorangegangener Entfernung der Chromogene mit Hilfe des Girard-Reagenzes.

Bei den Bullen ergab sich bei den ungereinigten 17-Ketosteroiden ein Mittelwert von 22,6 mg/Liter bzw. 214,8 mg/Tg, bei den gereinigten 17-Ketosteroiden einer von 8,2 mg/Liter bzw. 70,6 mg/Tg (Tab. 3 b)

Die 17-Ketosteroidausscheidung der Kühe ergab Mittelwerte von 16,7 mg/Liter bzw. 242,3 mg/Tg bei den ungereinigten und 6,5 mg/Liter bzw. 70,0 mg/Tg bei den gereinigten 17-Ketosteroiden (Tab. 3 b).

Die 17-Ketosteroidwerte von wachsenden Tieren sind sehr stark vom Alter abhängig. Daher können bei den hier untersuchten Kälbern die jeweils ermittelten Werte nur für das betreffende Alter der Tiere angegeben werden. So scheiden an ungereinigten 17-Ketosteroiden zwei 3-4 Wch. alte Kälber durchschnittlich 1,3 mg/Liter bzw. 7,0 mg/Tg, zwei ca. 5 Wch. alte Kälber im Mittel 1,9 mg/Liter bzw. 10,1 mg/Tg und ein ca. 7 Wch. altes Kalb 3,2 mg/Liter bzw. 19,0 mg/Tg aus. Die gereinigten 17-Ketosteroide wurden bei den Kälbern erst ab einem Alter von 5 Wch. bestimmt, da vorher die Werte zu niedrig liegen, um exakt ermittelt werden zu können. Sie betrugen bei zwei ca. 5 Wch. alten Kälbern 0,6 mg/Liter bzw. 3,3 mg/Tg, bei einem ca. 7 Wch. alten Kalb 0,9 mg/Liter bzw. 5,5 mg/Tg. (Tab. 3 b).

Bei den wenigen Kälberwerten erübrigt es sich, die Ausscheidungsrate zu diskutieren; dies wird später von anderen Untersuchern erfolgen.

Der Vergleich der hier festgestellten Werte in mg/Liter mit den im Schrifttum (*Meschaks*, 46; *Holcombe*, 32) für normale, unbelastete Rinder angegebenen mg/Liter-Werten ergibt annähernd übereinstimmende Ergebnisse.

Nach *Meschaks* (46) zeigten gesunde Bullen eine durchschnittliche Ausscheidung von 23,0 mg/Liter; der hier erhaltene Durchschnittswert beträgt 22,6 mg/Liter. *Holcombe* (32) gibt bei weiblichen, nicht trächtigen Rindern einen Mittelwert von 19,0 mg/Liter an, während sich

hier bei den Kühen ein Wert von 16,7 mg/Liter ergab. Die mg/Liter-Ausscheidungen werden von H o l c o m b e (32) auf ein durchschnittliches spezifisches Gewicht von 1,035 bezogen. Um hier ebenfalls solche, von der Größe der 24-Std.-Portion bzw. von den unterschiedlichen spezifischen Gewichten der einzelnen 24-Std.-Harnmengen unabhängige mg/Liter-Werte aufzustellen, wurden, am Beispiel der Bullen, die mg/Liter-Werte auf das mittlere spez. Gewicht der Bullen von 1,030 bezogen. Es ergaben sich dabei als Mittelwerte für die einzelnen Bullen:

| Tier                  | ungereinigte<br>17-Ketosteroide<br>mg/Liter | gereinigte<br>17-Ketosteroide<br>mg/Liter |
|-----------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Bulle A               | 20,8 $\pm$ 0,9                              | 7,2 $\pm$ 0,3                             |
| Bulle B (1.Versuch)   | -                                           | 9,9 $\pm$ 0,4                             |
| (2.Versuch)           | 26,7 $\pm$ 1,7                              | 9,0 $\pm$ 0,3                             |
| Bulle C               | 25,0 $\pm$ 2,8                              | 9,7 $\pm$ 0,5                             |
| Bulle D (1.Versuch)   | 22,3 $\pm$ 0,7                              | 7,0 $\pm$ 0,1                             |
| (2.Versuch)           | 25,9 $\pm$ 1,6                              | 7,3 $\pm$ 0,6                             |
| Bulle E               | 22,2 $\pm$ 1,1                              | 7,4 $\pm$ 0,4                             |
| Mittelwert der Bullen | 23,8 $\pm$ 1,0                              | 8,2 $\pm$ 0,5                             |

Die Abweichung der durchschnittlichen Werte der einzelnen Tiere vom Mittelwert sämtlicher Bullen, die aus Tabelle 3 b hervorgeht, entspricht - in Prozent ausgedrückt - einer Schwankung von 11,7 % bei den ungereinigten und 9,9 % bei den gereinigten mg/Tg-Werten; bei den Kühen beträgt die Schwankung 9,5 % bei den ungereinigten und 5,0 % bei den gereinigten mg/Tg-Werten.

Daraus ist ersichtlich, daß die Schwankung bei den gereinigten Werten etwas geringer ist. Es kann aber wohl gesagt werden, daß trotz dieser, vor allem bei den Bullen, von denen die meisten Werte vorliegen, verhältnismäßig geringen Schwankung die Anwendung des Girard-Verfahrens, das ja mit erheblich größerem Material- und Zeitaufwand verbunden ist, nicht notwendig erscheint, sondern daß ohne Girard-Reinigung ebenfalls brauchbare Ergebnisse erzielt werden.

Tatsächlich ist auch die Differenz zwischen der ungereinigten und der gereinigten Fraktion von sehr großer Konstanz. In der Tabelle 4 sind die Quotienten ungereinigte Fraktion : gereinigte Fraktion am Beispiel der Kuh II, die eine verhältnismäßig konstante 24-Std.- Harnmenge ausschied, aufgestellt. Daraus ist zu entnehmen, daß die mg/Tg-Werte der ungereinigten 17-Ketosteroide durchschnittlich  $2,49 \pm 0,05$  mal so hoch sind wie die der gereinigten 17-Ketosteroide. Diese Differenz zwischen ungereinigten und gereinigten Ketosteroidwerte muß chromogenen Stoffen ohne Ketogruppen zugeordnet werden, die bei der ungereinigten Fraktion mitbestimmt, bei der gereinigten dagegen mit dem Girard-Reagenz entfernt werden, und die bei dieser Tierart mit auffallender Konstanz zu messen sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß bei der Bestimmung der neutralen 17-Ketosteroide mit Hilfe der m-Dinitrobenzolreaktion nach Z i m m e r m a n n mit und ohne Entfernung der Harnfarbstoffe durch das Girard-Reagenz praktisch gleich gute Ergebnisse erzielt werden. Zieht man weiterhin den erheblich größeren Zeit- und Materialaufwand bei der Bestimmung der gereinigten 17-Ketosteroide in Betracht, so wird man der Bestimmungsmethode der ungereinigten 17-Ketosteroide den Vorzug geben.

## VII. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Ausscheidung der neutralen 17-Ketosteroiden im Harn - als Maß für den Funktionszustand der Nebennierenrinde - wurde bei 5 Bullen, 4 Kühen und 5 Kälbern mittels der m-Dinitrobenzolreaktion nach Z i m m e r m a n n bestimmt, und zwar vergleichend mit (sog. "gereinigte" 17-Ketosteroiden) und ohne (sog. "ungereinigte" 17-Ketosteroiden) Entfernung störender Harnfarbstoffe durch das Verfahren von G i r a r d und S a n d u - l e s c o .
2. Bei den Bullen ergab sich für die ungereinigten 17-Ketosteroiden ein Mittelwert von 214,8 mg/Tg, für die gereinigten 17-Ketosteroiden einer von 70,6 mg/Tg.
3. Bei den Kühen betrugen die Durchschnittswerte bei den ungereinigten 17-Ketosteroiden 242,3 mg/Tg, bei den gereinigten 17-Ketosteroiden 70,0 mg/Tg.
4. Die 17-Ketosteroid-Ausscheidung der Kälber ist stark vom Alter abhängig. Sie liegt bei 3 - 4 Wochen alten Tieren bei 7,0 mg/Tg ungereinigte 17-Ketosteroiden; gereinigte 17-Ketosteroiden können wegen der geringen Menge frühestens ab der 5. Lebenswoche bestimmt werden. Bei 5 Wochen alten Kälbern beträgt die Ausscheidung der ungereinigten 17-Ketosteroiden durchschnittlich 10,1 mg/Tg., die der gereinigten 17-Ketosteroiden 0,6 mg/Tg.
5. Die mg/Tg-Werte ohne GIRARD-Reinigung sind bei Normalausscheidung durchschnittlich 2,49 mal höher als diejenigen mit GIRARD-Reinigung; dies muß durch konstant vorkommende Harnfarbstoffe ohne Ketogruppen verursacht werden, die bei ersterem Verfahren mitbestimmt, bei letzterem dagegen mit dem GIRARD-Reagenz entfernt werden.
6. Beim Vergleich der Bestimmungsmöglichkeiten für neutrale 17-Ketosteroiden mit und ohne Entfernung störender Harnfarbstoffe ergibt sich, daß mit beiden Aufarbeitungsmethoden praktisch gleich gute Ergebnisse erzielt werden, so daß der Methode ohne GIRARD-Reinigung auf Grund ihres geringen Zeit- und Materialaufwandes der Vorzug gegeben werden kann.

# VIII. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Abderhalden, R. "Die Hormone" Springer-Verlag 1952
2. Abelin, I. "Spezielle klinisch-chemische Methoden"  
Verlag Hans Huber, Bern und Stuttgart 1952
3. Allen, E. a.  
Doisy, E.A. "On ovarian hormone. Preliminary report on its  
localization, extraction and partial purification and action in test animals."  
J.amer.med.Assoc. 81, 819, (1923)
4. Allen, W.M.,  
Hayward, S.J.,  
Pinto, A. "Color test for Dehydroisoandrosteron"  
J.clin.Endocrin. 10, 54 (1950)
5. Bloch, K. Rec.Progr.Hormone Res. 6, 111 (1951) ref.in 36.
6. Bloch, K. J. of biol.Chem. 23, 170 (1947), ref. in 36
7. Broster a. Patterson Brit.med.J. 781 (1948), ref. in 91.
8. Bühler, J.,  
Doisy, P.P. a.  
Doisy, E.A. Proc.Soc.Exper.Biol.A.Med. 72, 297 (1949),  
ref. in 93.
9. Brüggemann, J.,  
Bronsch, K.,  
Stubenrauch, M. "Über den inneren und äußeren Stoffwechsel des  
gesunden und kranken Haustieres. III. Mitteilung: Das funktionelle Verhalten von Hormon-  
systemen bei normalen und entwicklungsgestör-  
ten Schweinen."
10. Callow, N.H.,  
Callow, R.K. a.  
Emmens, C.W. "Colorimetric determination of substances  
containing grouping  $-CH_2CO-$  in urine extracts  
as indication of androgen content."  
Biochem. J. 32, 1312 (1938)
11. Callow, R.K. Lancet 565 (1936), ref. in 93.
12. Callow, R.K.,  
Callow, N.H.,  
Emmens, C.W. a.  
Stroud, S.W. J. of Endocrin. 1, 76 (1937), ref. in 93.

13. Cohen, S.L. "Die Hydrolyse von Steroidglucuroniden mit Kalbsmilz-Glucuronidase."  
J.biol.Chem. 192, 147 (1951)
14. Cohen, S.L. a. "Urinary ketosteroide in metabolism. I. Standardized chemical estimation."  
Salter, W.T. J. of biol.Chem. 152, 489 (1944), ref. in 79.
15. Dirscherl, W. u. Über die photometrische Bestimmung des Trans-Dehydroandrosterons im Harn und ihre Bedeutung für die Nebennieren-Diagnostik."  
Traut, H. Klin.Wschr. 30, 159 (1952)
16. Dirscherl, W. u. Naturwiss. 31, 349 (1943), ref. in 15.  
Zilliken, F.
17. Dirscherl, W. u. Biochem. Z. 319 407 (1949), ref. in 93.  
Zilliker, F.
18. Dobriner, K., "Studies in steroid metabolism. I. Methode for the isolation and quantitative estimation of neutral steroids present in human urine."  
Lieberman, S., J. of biol.Chem. 172, 241 (1948)  
Rhoads, C.P.
19. Dreker, J., "A rapid method for the determination of total urinary 17-ketosteroids."  
Pearson, S., J. of clin. Endocrin. 12, 795 (1947).  
Bartczak, E. a.  
Mc Gavack, T.H.
20. Dreker, J., J.clin. Endocrin, 12, 55 (1952), ref. in 93.  
Heisler, A.,  
Scism, G.R.u.Mit.
21. Fieser, L.F. a. "Lehrbuch der organischen Chemie."  
Fieser, M. Verlag Chemie GmbH., Weinheim/Bergstraße, 1954.
22. Frame, E. Endocrin. 34, 175 (1944), ref. in 2.
23. Friedgood, H.B. a. Rec.Progr. in Horm.Res. 2, 31 (1948), ref. in 93  
Garst, J.B.
24. Friedmann, H.C. Current Sci. 21, 282 (1952), ref. in 93.
25. Girard, A. u. "Eine neue Reihe von Reagentien auf die Karbonylgruppe; ihre Anwendung zur Extraktion von Ketonen und zur mikrochemischen Bestimmung von Aldehyden und Ketonen." Helv.chim.Acta 19, 1095 (1936).  
Sandulesco, G.

26. Hamblen, E.C. J.clin.Endocrin. 1, 777 (1941), ref. in 9o.
27. Heard, R., "The neutral lipide-soluble reducing substances  
Sobel, H., of urine as index of adrenal cortical function."  
Venning, E.H. J.biol.Chem. 165, 699 (1946).
28. Hechter, O., J.Americ.Chem.Soc. 71, 3261 (1949)  
Jacobsen, R.P. Arch. of Biochem. 25, 457 (195o)  
u. Mitarb. J.clin.Endocrin. 1o, 827 (195o), ref. in 66.
29. Hechter, O., Rec.Progr.Horm.Res. 6, 215 (1951), ref. in 66.  
Zaffaroni, A. u.  
Mit.
- 3o. Heilmeyer, L. "Allgemeine klinische Bedeutung des Hypophysen-Ne-  
bennierenrindensystems."  
Klin.Wschr. 3o, 865 (1952).
31. Hohlweg, W. "Über die Ausscheidung der Hormone im Harn."  
Klin.Wschr. 23, 45 (1944).
32. Holcombe, R.B. "The excretion of reducing corticoids and neutral  
steroids in the urine of cows with paturient paresis."  
The Brit.Vet.J. 1o9, 359 (1953).
33. Holtdorff, A.F., J. of Biol.Chem. 135, 377 (194o), ref. in 91.  
Koch, F.C.
34. Hoppe-Seyler- "Handbuch der physiologisch- und pathologisch-  
Thierfelder chemischen Analyse."  
1o. Aufl., 3.Bd., II.Teil; Springer-Verlag 1955.
35. Hübener, H.J., "Über eine neue Methode zur quantitativen Bestim-  
Hoffmann, E., mung der Nebennierenrindenhormone."  
Bode, F.: Hoppe-Seyler's Z.f.physiol.Chem. 289, 1o2 (1952).
36. Junkmann, K.: "Zentrale Steuerung der Sexualfunktionen.  
Androgene: Chemie, Biochemie und Nachweis."  
1. Symposion d.Deutsch.Ges.f.Endokrinologie;  
Springer-Verlag 1953.
37. Kendall, E.C.: J. of Biol.Chem. 128, 51 (1939), ref. in 66.
38. Kendall, E.C. u. "Isolation in crystalline form of hormone essential  
Mit. to life from suprarenal cortex; its chemical nature  
and physiologic properties." Proc.Staff.Meet.Mayo  
Clin. Rochester 9, 245 (1934).

39. König, V.L., J. of Biol. Chem. 141, 487 (1941), ref. in 93.  
Melzer, F. u.  
Mit.
40. Koets, P.: "The excretion of 17-ketosteroids in idiopathic  
Hirsutism."  
J.clin.Endocrin. 9, 795 (1949)
41. Laszt, L. "Physiologie des ACTH und der Nebennierenrinden-  
steroides."  
Freiburger Symposium 1952; Springer-Verlag 1953.
42. Loewe, S., "Sexualhormonbefunde im männlichen Harn."  
Voss, H.E., Klin.Wsehr. 7, 1376 (1928)  
Lange, F.,  
Wähner, A.
43. Mason, H.L. "Isolation of adrenal cortical hormones from  
urine: 17-hydroxycorticosterone and 17-hydroxy-  
11-dehydrocorticosterone."  
J. biol.Chem. 182, 131 (1950)
44. Mason, H.L. a. Physiol.Rev. 30, 321 (1950), ref. in 34.  
Engstrom, W.W.:
45. Matthias, D.: "Das histologische Verhalten der Nebennieren  
bei der Schweinepest (mit besonderer Berücksich-  
tigung der normalen Histologie der Nebennieren  
des Schweines)."  
Arch.f.exp.Vet.med. 8, 226, (1954).
46. Meschaks, P. "Excretion of neutral steroids in the urine of  
bulls with warmthinduced Aspermia" in "Mammalian  
germ cells"  
Little, Brown, a.Comp., Boston 1953.
47. Moore, C.R., "Seminal-vesicle and prostate function as a  
Gallagher, T.F.: testis hormone indicator; the electric ejacu-  
lation test."  
Amer.J.Anat. 45, 39 (1930)
48. Moore, C.R., "The effects of extracts of testis in correcting  
Gallagher, T.F. a. the castrated condition in the fowl and in the  
Koch, F.C. mammal."  
Endocrin. 13, 367 (1929).

49. Nelson, D.H.,                Science (Lancaster, Pa.) 111, 578 (1950,  
Reich, H.,                        ref. in 41.  
Samuels, L.T.:
50. Pfeffer, K.H. u.                "Das System Hypophyse-Nebennierenrinde."  
Staudinger, H.J.:                Angew.Chem. 63, 321 (1951)
51. Pfeffer, K.H.,                Z.f.Hormon-, Vitamin- u. Fermentforschg. 5,  
Staudinger, H.J.:                50 (1952), ref. in 66.
52. Pfister, H.:                Beitrag zur Methodik der 17-Ketosteroid-Bestimmung."  
Biochem.Ztschr. 323, 157 (1952).
53. Pincus, G.:                Endocrin. (Springfield III) 32, 176 (1943),  
ref. in 93;  
J.clin.Endocrin. 3, 195, (1943), ref. in 95.
54. Pincus, G.:                "Adrenal cortex"  
Trans. 1<sup>st</sup> Conference, New York 1950.
55. Pincus, G.,                2<sup>nd</sup> Clinical ACTH-Conference, Vol. I, p. 40  
Hechter, O.,                        (1951), ref. in 66.  
Zaffaroni, A.:
56. Porter, C.C.,                J. of Biol. Chem. 185, 201 (1950), ref. in 93.  
Silber, R.H.:
57. Reichstein, T.:                "Über Bestandteile der Nebennierenrinde.  
VI. Trennungsmethoden sowie Isolierung der  
Substanzen F.a., H. und J."  
Helv.Chim.Acta 19, 1107 (1936).
58. Reichstein, T.:                "Über Cortin, das Hormon der Nebennierenrinde."  
Helv.chim.Acta 19, 29 (1936)
59. Reichstein, T.:                "Über Bestandteile der Nebennierenrinde.  
X. Zur Kenntnis des Corticosterons."  
Helv.chim. Acta 20, 953 (1937)
60. Reichstein, T.,                "Über Bestandteile der Nebennierenrinde.  
v. Euw, J.:                        XX. Isolierung der Substanzen Q (Desoxycorti-  
costeron) und R sowie weiterer Stoffe."  
Helv.chim.Acta 21, 1197 (1938)
61. Reichstein, T.,                "The hormones of the adrenal cortex."  
Shoppee, C.W.:                        Vitamins and Hormones 1, 345 (1943)

62. Sartorius, H. "Die Ausscheidung der 17-Ketosteroide im Harn. Eine Methode zur Beurteilung der Nebennierenrindenaktivität?"  
Klin.Wschr. 28, 772 (1950)
63. Selye, H.: "Das allgemeine Anpassungssyndrom und die Anpassungskrankheiten."  
Dtsch.med.Rdsch. 2, 161 (1948)
64. Schmitt, H.: "Methoden zur Bestimmung der Schilddrüsen- und Nebennierenrindenaktivität bei Schweinen."  
Vet.med.Diss. München 1953.
65. Staemmler, M.: "Nebennierenrinde und männliche Genitalorgane."  
Virchows Archiv 316, 476 (1949)
66. Staudinger, H.J.: "Biochemie der Nebennierenrindensteroiden und des ACTH."  
Freiburger Symposion 1952; Springer-Verlag 1953.
67. Staudinger, H.J.: "Die wichtigsten Wirkungen der Nebennierenrinde."  
Med.Mschr. 9, 4:213 (1955)
68. Staudinger, H.J.,  
Bauer, V.: "Zur Bestimmung der an Glucuronsäure gebundenen Corticoide im Harn."  
Klin.Wschr. 32, 330 (1954)
69. Staudinger, H.J.,  
Schmeisser, M.: "Die Bestimmung der Nebennierenrindensteroidhormone im Harn."  
Biochem.Ztschr. 83, 321 (1950)
70. Stimmel, B.F.,  
Randolph, J.D.,  
Conn, W.W.: J.clin.Endocrin. 12, 371, (1952), ref. in 93.
71. Stitch, S.R.,  
Halkerston, J.D.: Nature (London) 172, 398 (1953), ref. in 93.
72. Schulzev, G.P. "Über die klinische Bedeutung der Bestimmung der 17-Ketosteroide im Harn."  
ref. in Med.Kl. 46, 1212 (1951)
73. Talbot, N.B.,  
Eitington, I.V.: J. of biol.Chem. 154, 605 (1944), ref. in 93.

74. Tansey, R.P., J.Amer.Pharm.Assoc. 39, 66o (195o), ref. in 93.  
Cross, J.M.:
75. Venning, E.H.: "Adrenal function in pregnancy."  
Endocrin. 39, 2o3 (1946)
76. Verzár, F.: "Die Funktion der Nebennierenrinde."  
Verlag Benno Schwabe & Co., Basel 1939
77. Verzár, F.: "Stoffwechselwirkungen des Nebennierenrinden-  
hormons."  
Schweiz.med.Wschr. 8o, 468 (195o)
78. Vogt, M.: J.of Endocrin. 5, 57 (1948)  
Brit.Med.J. 1242 (195o)  
J.Physiol. 113 (1951), ref. in 66.
79. Walter, K.: "Zur Bestimmung der 17-Ketosteroide im Harn."  
Klin.Wschr. 3o, 474 (1952).
- 8o. Weise, W., "Untersuchungen über die Jaffé'sche Pikrin-  
Tropp, C.: säurereaktion."  
Z.physiol.Chem. 178, 125 (1928)
81. Weissbecker, L., "Dehydroisoandrosteron- und 17-Ketosteroidbe-  
Wilde, H., stimmung nach Girard-Trennung als Routine-  
Engel, S.: methode."  
Rö. u. Lab. Prax. 6, 3o9 (1952)
82. Wintersteiner, O., "Chemical studies on the adrenal cortex.  
Pfiffner, J.: III. Isolation of two new physiologically  
inactive compounds."  
J. biol.Chem. 116, 291 (1936).
83. Whitten, W.K.: J. exp. Biol. 21, 187 (1945), ref. in 32.
84. Zimmermann, W.: "Eine Farbreaktion der Sexualhormone und ihre  
Anwendung zur quantitativen colorimetrischen  
Bestimmung."  
Z.physiol.Chem., I. Mitt., 233, 257 (1935)
85. Zimmermann, W.: "Colorimetrische Bestimmung der Keimdrüsen-  
hormone."  
Z.Physiol.Chem. 47, 245 (1937)

86. Zimmermann, W.: "Farbreaktionen und chemische Bestimmungsmethoden von Keimdrüsenhormonen."  
Klin.Wschr. 17, 1103 (1938)
87. Zimmermann, W.: "Die Methodik der Colorimetrie von Keimdrüsenhormonen und ihre klinische Anwendbarkeit."  
Habil.-Schrift, Breslau, 1942.
88. Zimmermann, W.: "Die klinische Bedeutung der chemischen Bestimmung männlicher Hormone."  
Klin.Wschr. 78 (1944)
89. Zimmermann, W.: "Photometrische Bestimmung von Keimdrüsenhormonen." Vitamine und Hormone 5, 1/124/152/170/237/260/276 (1944)
90. Zimmermann, W.: "Bestimmung von Keimdrüsenhormonen mittels der m-Dinitrobenzolreaktion."  
Schweiz.med.Wschr. 76, 805 (1946)
91. Zimmermann, W.: "Die 17-Ketosteroide, ihre Bedeutung und die Methodik ihrer Bestimmung."  
Dtsch.Med.Wschr. 76, 1362 (1951)
92. Zimmermann, W.: "Zur Methodik der Bestimmung der 17-Ketosteroide." Z.f. Vitamin-, Hormon- und Fermentforschung. 4, 456 (1951)
93. Zimmermann, W.: "Chemische Bestimmungsmethoden von Steroidhormonen in Körperflüssigkeiten."  
Springer-Verlag 1955.
94. Zimmermann, W.,  
Anton, H.U.,  
Pontius, D. "Die Eliminierung störender Chromogene bei der Bestimmung der 17-Ketosteroide mit m-Dinitrobenzol."  
Z.f.physiol.Chem. 289, 91 (1952)

Am Ende meiner Arbeit erlaube ich mir, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Dr. Johannes Brüggemann, für die Überlassung des Themas aufrichtigen Dank zu sagen.

Weiterhin gilt mein herzlicher Dank Herrn Privatdozent Dr. Kurt Bronsch aus dem Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere für die Unterstützung und Förderung meiner Arbeit.

Ebenso danke ich Fräulein Maria Kroczeck, Chemotechnikerin am Physiologischen Institut, für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Auch der Klinik für Tiergeburtshilfe und Gynäkologie, die mir die Versuchstiere zur Verfügung stellte, bin ich zu großem Dank verpflichtet.

## Lebenslauf

Am 20. November 1932 wurde ich, Christine Stock, als Tochter des Chemikers Dr. Paul Stock und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Braun, in München geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Starnberg von 1939 bis 1943 trat ich in die Oberschule Starnberg ein. Von 1944 bis 1945 besuchte ich die Heimschule Reichersbeuern, von 1945 bis 1949 die Mädchenoberrealschule Tutzing und von 1949 bis 1951 die Oberrealschule mit Gymnasium Weilheim, an der ich im Juli 1951 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1951/52 begann ich mein Studium an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München und wurde im Sommersemester 1952 zum Studium an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München zugelassen, der ich während meiner ganzen Studienzeit angehörte. Im Februar 1954 legte ich die tierärztliche Vorprüfung ab und beschloß im Januar 1957 mein Studium mit der tierärztlichen Prüfung.



